Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Eukaryonten-Zellen, insbesondere auf den Energie-Stoffwechsel von Trypanosoma brucei brucei

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Duszenko
aus Dortmund

1983

UNIV. LEIDEN BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543906_0001

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Eukaryonten-Zellen, insbesondere auf den Energie-Stoffwechsel von Trypanosoma brucei brucei

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Duszenko
aus Dortmund

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	2. November 1983
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Wendel

Abstract

Duszenko, Michael

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Eukaryonten-Zellen, insbesondere auf den Energie-Stoffwechsel von Trypanosoma brucei brucei.

Das Antibioticum Pentalenolacton ist ein Hemmstoff der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Am Beispiel verschiedener Eukaryonten-Zellsysteme wurde untersucht, ob Pentalenolacton als spezifischer Inhibitor der Glykolyse unter in vivo - Bedingungen eingesetzt werden kann und welche Konsequenzen das für den gesamten Zellstoffwechsel hat. Darüber hinaus wurde geklärt, welche Wirkungen es auf den tierischen Gesamt-Organismus ausübt.

In allen untersuchten Zelltypen wird das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zwar gleichermaßen durch das Antibioticum gehemmt, dennoch resultieren daraus verschiedene Konsequenzen.
Zellen, deren Energiestoffwechsel hauptsächlich durch die Atmungskette getragen wird (Hepatocyten und procyclische Trypanosomen), tolerieren die Anwesenheit von Pentalenolacton in geeigneten Medien und die Hemmung der Glykolyse bleibt folgenlos. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß es als selektiver Glykolyse-Inhibitor verwendet werden kann.
Hingegen werden Zellen, die den Energieträger ATP ausschließlich oder hauptsächlich aus der Glykolyse beziehen (Erythrocyten, Ehrlich Ascites Tumor Zellen, sowie die Wirbeltierformen von Plasmodien und Trypanosomen) letal geschädigt.
Für Ehrlich Ascites Tumor Zellen sowie für die Blutformen der Protozoen Plasmodium vinckei, Plasmodium falciparum und Trypanosoma brucei konnte geklärt werden, daß die Glykolyse essentiell ist.
Pentalenolacton bewirkt in Labortieren in erster Linie eine massive toxische Hämolyse. Die Letaldosis für Mäuse beträgt etwa 100 µg/Tier. Dennoch erfolgt eine rasche metabolische Inaktivierung und Ausscheidung durch den Harn.
In situ ist mit Pentalenolacton-Konzentrationen unterhalb der Letaldosis keine Verminderung des Wachstums von Parasiten und von Ehrlich Ascites Tumor Zellen zu erzielen.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke in der Zeit von Juli 1979 bis April 1983 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, für wertvolle Anregungen, sowie für die großzügige Unterstützung, mit der er diese Arbeit gefördert hat.

Ich danke den Herren Dr. R. Brun und Dr. L. Jenni vom Schweizerischen Tropeninstitut Basel für die Einweisung in die Kultivierungstechnik von Trypanosomen, darüber hinaus aber auch für die Überlassung von Zellen, wodurch ich erst in die Lage versetzt wurde, dieses System bei uns zu etablieren.

Für die Überlassung von Zellen sowie für hilfreiche Diskussionsbeiträge bin ich folgenden Herren zu Dank verpflichtet: Prof. Dr. P. Overath vom Max Planck Institut für Biologie in Tübingen, Prof. Dr. W. Frank vom Institut für Parasitologie der Universität Hohenheim und Dr. A. Jung vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.

Herrn Dr. R. Gebhardt und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für ihre Unterstützung bei der Kultivierung von Hepatocyten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Spira von der New Hebrew University in Jerusalem für die Einweisung in die Plasmodien-Kultivierung, sowie für seine Mithilfe bei den damit durchgeführten Zellversuchen.

Herrn Diplom-Biochemiker D. Zdunek danke ich für die Überlassung von hochgereinigtem Pentalenolacton und Herrn Diplom-Biochemiker K.H. Maurer für seine kollegiale Hilfe bei der Reinigung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Trypanosomen.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

DAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
EATC	Ehrlich Ascites Tumor Zellen
EBSS	EARLE´s balanced salt solution
FBP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FBS	foetales Rinderserum
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin-Äthansulfonsäure
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
PL	Pentalenolacton
SC-Lösung	Sucrose-Citrat-Lösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHAM	Salicylhydroxamsäure
VAT	variabler Antigentyp
VSG	variable Oberflächen-Glykoproteide

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

1. Allgemeine Übersicht 1
2. Fermentierung und Reinigung von Pentalenolacton 3
3. Zielsetzung dieser Arbeit 4

II. Wirkung von Pentalenolacton auf den tierischen Gesamtorganismus 6

A. Einleitung 6

B. Spezielle Methoden 6

1. Applikationsform 6
2. Organentnahme 7
3. Blutentnahme 7

C. Ergebnisse 8

1. Bestimmung der letalen Dosis 8
2. Phänomenologische Beschreibung der Pl-Wirkung in situ 8
3. Hemmung der GAP-DH - Aktivität in verschiedenen Organen und im Blut 9
4. Hemmung der GAP-DH - Aktivität in der Leber und in den Blutzellen bei Gabe von subletalen Pl-Dosen 12
5. Nachweis von freiem Pentalenolacton im Blut, in der Leber und im Urin 13
6. Versuche mit radioaktiv markiertem Pentalenolacton 14
   a) Nachweis im Blut und in verschiedenen Organen 14
   b) Nachweis im Urin 17
7. Diskussion 19

III. Wirkungsweise von Pentalenolacton auf verschiedene Eukayonten-Zellsysteme 21

A. Einleitung 24

B. Spezielle Methoden 24

1. Zellisolierungs- und Kultivierungstechniken 24
a) Erythrocyten 24
b) Hepatocyten 24
Zellisolierung 24
Zellkultivierung 25
c) Ehrlich Ascites Tumor-Zellen 25
Anzucht und Gewinnung 25
Zellkultivierung 26
d) Plasmodium vinckei 26
e) in vitro - Kultivierung von Plasmodium falciparum 26

C. Ergebnisse 27

1. Wirkung von Pentalenoalcton auf Eukaryonten 27
2. Wirkung von Pentalenolacton auf Hepatocyten 33
a) Bestimmung der GAP-DH - Aktivität 36
b) Auswertung der mikroskopischen Kontrollen 37
c) Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase - Aktivität 38
3. Wirkung von Pentalenolacton auf Ehrlich Ascites Tumor-Zellen 41
a) Bestimmung der Pentalenolacton-Wirkung auf EAT-Zellen 41
b) Bestimmung der Pentalenoalcton-Wirkung auf in vitro-Kulturen 45
c) Bestimmung der Pentalenoalcton-Wirkung unter in situ-Bedingungen 46
4. Wirkung von Pentalenolacton auf Plasmodium vinckei und Plasmodium falciparum 48
5. Diskussion 56

IV. Untersuchungen zum Energiestoffwechsel von Trypanosoma brucei 58

A. Einleitung 58
Morphologie, Variable Antigene, Biochemische Aspekte des Trypanosomen-Stoffwechsels, in vitro - Kultivierung der Trypanosomen

B. Spezielle Methoden 70

1. Handhabung der Trypanosomen in in situ - Versuchen 70

2. Isolierung der Trypanosomen aus dem Blut 70
3. Anlegen von Trypanosomen-Suspensionen 72
4. In vitro - Kulturen der Blutform 73
a) Kultivierung der Microtus montanus-Zellen 73
b) Trypsinierung des Zellrasens 73
c) Anlegen von in vitro - Trypanosomen-Kulturen 74
d) Trypanosomen-Kulturen mit Hepatocyten als feeder layer 75
5. In vitro - Kulturen von procyclischen Trypanosomen 76
6. Gewinnung von Kaninchenserum 76
7. Anlegen von Stabilaten 77
a) Dauerkulturen von Trypanosomen 77
b) Dauerkulturen von Microtus montanus-Zellen 77
8. Präparation von Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen 77
9. Isolierung der GAP-DH aus Trypanosomen 79
10. Elektrophorese - Bedingungen 79

C. Ergebnisse 81

1. Experimenteller Umgang mit Trypanosomen 81
a) Parasitaemie-Verlauf bei monomorphen und pleomorphen Trypanosomen 81
b) Isolierung der Trypanosomen mittels Ficoll Paque® 82
2. Erste Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf isolierte Trypanosomen 87
3. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Trypanosomen unter in situ - Bedingungen 90
a) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Erythrocyten und Trypanosomen 92
b) Versuche zum Nachweis mitochondrialer Atmung in Blutformen bei Pl-Belastung 95
c) Können Trypanosomen die GAP-DH - Hemmung durch eine rasche Enzymneusynthese bzw. durch Aktivierung eines inaktiven Enzympools kompensieren oder besitzen sie ein nicht Pl-sensitives Enzym? 96

d) Besitzen Trypanosomen neben der Glykolyse einen weiteren, bisher nicht bekannten Stoffwechselweg zur Energiegewinnung? 100
e) Wird Pentalenolacton von Trypanosomen unter in situ-Bedingungen aufgenommen? 109
4. Versuche mit in vitro - Kulturen von Trypanosomen 114
a) In vitro - Kulturen der Blutform nach Brun und Jenni 114
b) In vitro - Kulturen der Blutform mit Hepatocyten als feeder layer 118
c) In vitro - Kulturen von procyclischen Trypanosomen 121
5. Isolierung und Charakterisierung der GAP-DH aus T. brucei 124
6. Diskussion 133

V. Schlußbetrachtung und Ausblick 137

VI. Anhang 142
1. Geräte 143
2. Verbrauchsmittel 144
3. Lösungen und Medien 146
4. Versuchstiere, Zellinien und Stämme der verwendeten Mikroorganismen 153
5. Allgemeine Methoden 156

VII. Literaturverzeichnis 160

I. Einleitung

1. Allgemeine Übersicht

Das Antibioticum Pentalenolacton wurde erstmals 1956 von Koe et al. (20) aus dem Kulturfiltrat von Streptomyceten isoliert und in Ansätzen charakterisiert. Die Autoren nannten dies neue Antibioticum zunächst PA 132. Der erste Strukturvorschlag stammt von Takeuchi et al. (39), der aufgrund der dominierenden Molekülmerkmale auch den Namen "Pentalenolacton" einführte. Diese vorläufige Molekülstruktur mußte durch neuere spektroskopische Daten leicht korrigiert werden (Martin et al., 1970 (26)) und wurde schließlich durch die Arbeiten von Danishefsky et al. (9) bestätigt, denen 1978 die erste stereospezifische Totalsythese der Verbindung gelang (Abb. I.1).

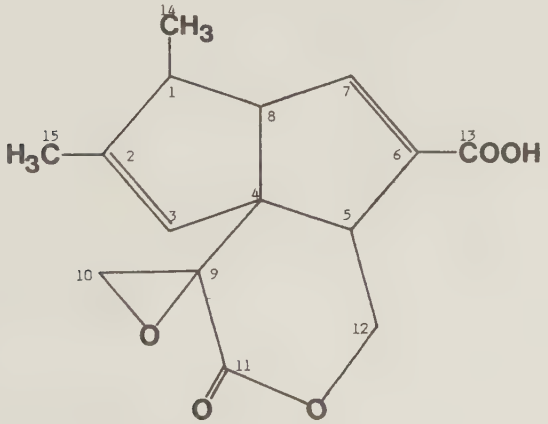


Abb. I.1: Pentalenolacton

Eine Reihe weiterer Arbeiten, insbesondere aus den Gruppen von Seto und Yonehara (36-38), sowie von Cane (5-8) beschäftigten sich mit der Biosythese von Pentalenolacton und konnten zeigen, daß die Verbindung über den Sesquiterpenweg synthetisiert wird. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden von Seto et al. (36-38) mehrere sehr ähnliche Verbindungen aufgefunden, die als biosynthetische Vorstufen des Moleküls gelten: die tricyclischen Sesquiterpene Pentalenen und Pentalen-Säure, sowie die Penta-

lenolactone G und H, die verschiedene Substituenten an den C-Atomen 1 bzw. 2 aufweisen. Darüber hinaus wurden im Kulturfiltrat von Streptomyceten noch drei weitere Modifikationen gefunden, nämlich Pentalenolacton E (4), sowie Pentalenolacton-D und Pentalenolacton-C (1,21). Bei diesen Varianten ist der Epoxidring im Pentalenolacton-Molekül durch eine Methylen- (E) oder eine Diol- (D) bzw. Chlorhydrin- (C) Gruppe ersetzt.

Erste Untersuchungen zur antibiotischen Potenz von Pentalenolacton stammen ebenfalls aus dem Jahre 1956 (12), wobei die Autoren ein breites Spektrum gram-positiver und gram-negativer Bakterien sowie zwei Protozoen (Trichomonas vaginalis und Entamoeba histolytica) und verschiedene Pilze als Testorganismen verwendet haben, die alle -wenn auch mit unterschiedlichen Dosen- hemmbar waren. Diese Arbeit enthält jedoch keine Angaben über den möglichen Wirkmechanismus der Substanz. Erst 1971 zeigte dann Lemke (24), daß eine ausgeprägte Hemmwirkung des Antibioticums bei Mikroorganismen nur dann auftrat, wenn diese in definierten Medien mit fermentierbaren Zuckern (Glucose, Fructose, Ribose, Glycerin) als einziger C-Quelle angezogen wurden. Hierbei trat mit allen verwendeten Substraten dieselbe minimale Hemm-Konzentration auf. Hingegen konnte die Hemmung durch Zusatz von Pyruvat oder Lactat, durch verschiedene Metabolite des Citrat-Cyclus sowie durch mehrere Aminosäuren aufgehoben werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß der primäre Angriffsort für Pentalenolacton in der Glykolyse lokalisiert ist, und zwar im Bereich zwischen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Kinase, da einige der verwendeten Substrate erst auf der Stufe des Glycerinaldehyd-3-Phosphats in die Glykolyse einmünden. Es wurde zunächst angenommen (21, 24), die Wirkung des Antibioticums würde die Pyruvat-Kinase betreffen, da in vitro eine gewisse Hemmung der Enzymaktivität erreicht werden konnte. Dazu mußten allerdings etwa 50fach höhere Pentalenolacton-Konzentrationen eingesetzt werden als in vivo, und darüber hinaus war auch nur eine max. 60%ige Inaktivierung des Enzyms möglich. Hartmann nahm diese Versuche schließlich wieder auf und konnte zeigen, daß die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) um mehrere Zehnerpotenzen empfindlicher ist als die Pyruvat-Kinase, daß sie vollständig gehemmt werden kann und zudem irreversibel geschädigt wird

(15-17). Da die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase während der Evolution eine relativ konstante Struktur bewahrt hat (18), scheint die Sensitivität des Enzyms gegenüber Pentalenolacton ein allgemeines Phänomen zu sein. So wird auch das bereits erwähnte, für ein Antibioticum ungewöhnlich breite Wirkungsspektrum verständlich.
Bislang sind allerdings zwei GAP-DH´s beschrieben worden, die durch Pentalenolacton nicht hemmbar waren. Einerseits untersuchte Mann (25) die drei in Spinat vorkommenden GAP-DH´s. Hier existieren neben dem üblicherweise vorkommenden NAD-abhängigen Enzym (GAP-DH: EC 1.2.1.12) noch zwei weitere Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen, die entweder nur NADP (GAP-DH: EC 1.2.1.9) oder aber NAD und NADP (GAP-DH: EC 1.2.1.13) als Coenzym akzeptieren. Wie er zeigen konnte, ließ sich sowohl das NAD-, als auch das NAD-/NADP-Enzym inhibieren. Das nicht reversible, nicht phosphorylierende NADP-abhängige Enzym wurde durch das Antibioticum jedoch nicht gehemmt. Und zweitens zeigten die Arbeiten von Balla (2), sowie von Pfeiffer (32, 33) und schließlich von Maurer (27), daß der Erzeugerstamm (Streptomyces arenae TÜ 469) eine NAD-abhängige Pentalenolacton-insensitive GAP-DH besitzt, wenn er das Antibioticum produziert. Allerdings enthält der Stamm solange ein sensitives Enzym, wie kein Pentalenolacton gebildet wird. Diese beiden Enzyme unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der Größe voneinander, und während die Pl-sensitive Form die für GAP-DH´s allgemein verbreitete tetramere Struktur besitzt, ist die insensitive Form offenbar aus acht Untereinheiten zusammengesetzt (28).

2. Fermentierung und Reinigung von Pentalenolacton

Zur Gewinnung des Antibioticums wurde stets der Stamm Streptomyces arenae TÜ 469 (DSM 40 734) verwendet. Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte die Anzucht und Fermentation des Stammes sowie die Reinigung von Pentalenolacton nach den bereits beschriebenen Verfahren (10, 17). Die Fermentation wurde dabei im 20 l bzw. 200 l Maßstab durchgeführt. Später konnte sowohl die Fermentation als auch die Reinigungsprozedur von Zdunek in einigen Punkten optimiert werden (44, 45), und zudem ergab sich die Möglichkeit, die Fermentation und die ersten Reinigungsschritte bei der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GbF) in Braunschweig durchzuführen, wobei Ansätze von 4000 l zum Einsatz kamen (22, 23). Die

Endreinigung erfolgte dann durch ein von W. Oberrauch und D. Zdunek entwickeltes Verfahren mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC). Hierbei wurde ein chromatografisch einheitliches Produkt isoliert, das eindeutig als Pentalenolacton-C identifiziert wurde (45). Im Verlauf dieser Arbeit wurden alle Untersuchungen mit dieser Modifikation durchgeführt.

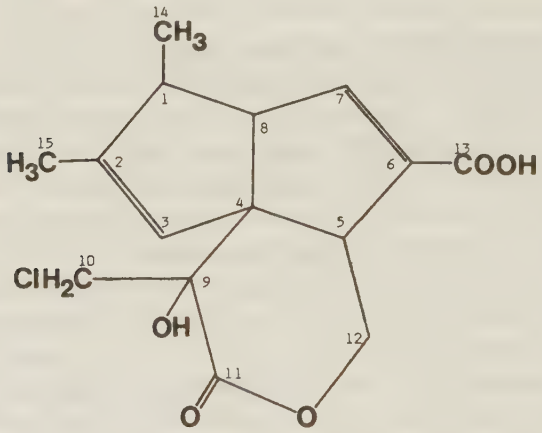


Abb. I.2: Pentalenolacton-C (Chlorhydrin-Form).

3. Zielsetzung dieser Arbeit

Aus dem zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen konnte der Schluß gezogen werden, daß im Zellstoffwechsel durch geringe Pentalenolacton-Konzentrationen ausschließlich die GAP-DH gehemmt wird, da die Wachstumshemmung von Mikroorganismen durch geeignete Substrate aufgehoben werden konnte. Wie meine eigenen Arbeiten zudem gezeigt hatten (10), kann das Antibioticum prinzipiell auch in verschiedenen Eukaryonten-Zellsystemen eingesetzt werden, und führt dort ebenfalls zur Hemmung der Glykolyse. Da zudem die Struktur der GAP-DH in allen Organismen bemerkenswert konstant ist (18), lag die Vermutung nahe, daß Pentalenolacton einen universell einsetzbaren Hemmstoff der Glykolyse darstellen könnte. In der biochemischen Grundlagenforschung besteht für spezifische Inhibitoren des Intermediärstoffwechsels ein großer Bedarf, anderer-

seits existieren aber keine selektiven, in vivo einsetzbaren Glykolysehemmer. Diese Arbeit sollte darum zeigen, ob Pentalenolacton einen solchen Anspruch erfüllen kann. Die für diese Untersuchungen ausgewählten Zellsysteme sollten eine Aussage darüber erlauben, inwieweit der Gesamt-Zellstoffwechsel durch das Antibioticum belastet wird, und welche Konsequenzen der Einsatz von Pentalenolacton für solche Zelltypen hat, die im Energiestoffwechsel überwiegend auf die ATP-liefernden Reaktionen der Glykolyse angewiesen sind. In diesem Zusammenhang war auch die Frage zu klären, ob solche Zellen (Parasiten, Tumor-Zellen) unter in situ-Bedingungen selektiv durch Pentalenolacton beeinflußt werden können. Das machte die Bestimmung der Toxizität und des Einflusses, den das Antibioticum auf Labortiere ausübt, notwendig.
Darüber hinaus sollten Beobachtungen an Zell-Kulturen zeigen, ob Pentalenolacton unter den gegebenen Kulturbedingungen eine letale Schädigung der verwendeten Zellsysteme verursacht, oder ob die Zellen -trotz Hemmung der Glykolyse- überleben können. Die Einarbeitung in verschiedene Zellkultivierungstechniken war darum eine wesentliche methodische Voraussetzung für diese Arbeit.

II. Wirkung von Pentalenolacton auf den tierischen Gesamtorganismus

A. Einleitung

Wie bereits dargelegt, war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, Pentalenolacton auch in situ einzusetzen, um Aussagen darüber zu erhalten, ob Pl das Wachstum von Parasiten und Tumor-Zellen unter diesen Umständen selektiv hemmen kann. Andererseits lag es auf der Hand, daß das Antibioticum für den Gesamtorganismus eine große Belastung darstellen würde, da verschiedene Zellsysteme in ihrer Funktion auf eine intakte Glykolyse angewiesen sind, die sie im Energiestoffwechsel nicht ersetzen können. Dazu gehören die Erythrocyten, das Nierenmark sowie die Gehirnzellen; in diesem Zusammenhang war es auch von Interesse, in welchem Ausmaß Pl die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden vermag.
Die Frage war also, in wieweit solche Zellen geschädigt werden, und welche Pentalenolacton-Konzentrationen der Organismus noch toleriert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche signifikanten Veränderungen an einzelnen Organen auftreten, ob bei verschiedenen Applikationsformen unterschiedliche Wirkungen resultieren, in wieweit Pentalenolacton metabolisiert werden kann und wie es schließlich wieder ausgeschieden wird.

B. Spezielle Methoden

1. Applikationsformen

Für die in situ - Anwendung von Pentalenolacton wurden vier verschiedene Applikationsformen gewählt, nämlich intraperitoneal, intravenös, subcutan und per oral. In beinahe allen Fällen wurden Stammlösungen von 3-5 mg Pl/ml verwendet, wobei das Antibioticum in Äthanol gelöst war. Zur Anwendung wurde diese Stammlösung in der Regel mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:5 bzw. 1:20 ($EtOH:H_2O$) verdünnt, so daß die jeweils angestrebte Endkonzentration in Volumina von 50-200 µl gelöst war. Die dabei zwangsläufig auftretende Äthanolbelastung war für die Tiere unkritisch. Für die orale Gabe wurde die Stammlösung mit Leitungswasser verdünnt, wobei die Tiere die entsprechende Pl-Menge mit ihrer Tagesration an Trinkwasser, die zu etwa 5 ml/Tag ermittelt wurde, aufnahmen. Die intravenöse Applikation wurde in Käfigen durchgeführt, in denen die Mäuse

so fixiert werden konnten, daß die Schwanzvenen gut zugänglich waren. Intravenös verabreichte Lösungen enthielten Pentalenolacton stets in Äthanol/physiol. Kochsalzlösung und wurden immer sterilfiltriert.

2. Organentnahme

Für Organ- und Blutentnahmen wurden die Tiere stets mit Äther getötet, dann wurden die Organe entweder vollständig (Milz, Niere, Herz, Gehirn) oder teilweise (Muskel, Leber) entnommen. Die Organe wurden sofort mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und dann ebenfalls mit eiskalter Kochsalzlösung zu einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgenommen. Die Gewebe wurden im Kühlraum homogenisiert (Dounce Homogenisator) und anschließend unter Eiskühlung je 10 sec. beschallt (Branson Sonifier B-12, Stufe 3). Nach dem Zentrifugieren in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurden die klaren Überstände zur GAP-DH Bestimmung und zur Messung der Protein-Konzentrationen verwendet.

3. Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurde der Brustkorb der getöteten Tiere durch zwei parallel zum Sternum geführte Schnitte eröffnet. Auf diese Weise ist der Thorax von oben frei zugänglich, ansonsten aber allseits geschlossen und kann somit als "Sammelgefäß" für das austretende Blut dienen. Es wurden etwa 500 µl Sucrose-Citrat-Lösung in den Brustraum vorgelegt, dann wurde die obere Hohlvene durchtrennt. Das in den Thorax ausgetretene Blut wurde entnommen. Anschließend wurde das Herz punktiert (16er Kanüle) und das Gefäßsystem mit soviel SC-Lösung "gespült", bis das vereinigte Sucrose-Citrat-Blut ein Gesamtvolumen von 4 ml besaß. In diesem Fall wurde dieses Verfahren dem Heparinisieren vorgezogen, um die Organe möglichst blutfrei zu spülen. Das Sucrose-Citrat-Blut wurde zentrifugiert (800 x g, 10 min.) und der Überstand (Serum und Sucrose-Citrat) abgehebert. Die Zellen wurden zweimal mit Hepes-Medium gewaschen und anschließend in 4 ml Hepes-Medium aufgenommen und 10 sec. beschallt (vergl. oben). Der Rohextrakt wurde nochmals zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und der klare Überstand zur Bestimmung der GAP-DH - Aktivität und der Proteinkonzentration verwendet.
Die tatsächliche Verdünnung des Blutes mit Sucrose-Citrat-Lösung ließ sich durch Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer ermitteln. Sie

betrug im Mittel etwa 1:3, d.h., pro Maus wurden auf diese Weise ca. 1,4 ml Blut gewonnen.

C. Ergebnisse

1. Bestimmung der letalen Pentalenolacton-Dosis

Bestimmungen der für Mäuse letalen Pl-Dosis wurden im Verlauf der Arbeit vielfach durchgeführt, häufig auch zusammen mit anderen Versuchsansätzen, z.B. als Kontrollen in Parasitaemie-Versuchen. In all diesen Fällen bestätigte sich, daß die Letaldosis (unabhängig von der angewandten Applikationsform) zwischen 50 und 100 µg Pl pro Tier lag, was einer Konzentration von etwa 2-4 mg/kg Körpergewicht entspricht. Repräsentativ für diese Messungen soll eine Versuchsdurchführung dargestellt werden, bei der unterschiedliche Mengen Pl intravenös gespritzt wurden

Applizierte Pl-Menge	24 h nach Pl-Gabe	48 h nach Pl-Gabe
25 µg 50 µg	Die Tiere zeigten eine signifikante Anämie, ansonsten aber normales Verhalten.	Die Tiere zeigten einen guten Allgemeinzustand, Anzeichen einer Anämie bestanden nicht mehr.
100 µg 200 µg	Die Tiere zeigten eine schwere Anämie und einen sehr schlechten Allgemeinzustand.	Die Tiere waren verendet.

Tab. II.1: Wirkung verschiedener Pl-Dosen in situ.

Die mit subletalen Dosen behandelten Mäuse erlitten durch die eingesetzte Pl-Menge zwar eine deutlich ausgeprägte Anämie, erholten sich jedoch rasch wieder und zeigten auch in der Folgezeit (mehrere Wochen lang) keine Spätfolgen dieser Behandlung.

2. Phänomenologische Beschreibung der Pl-Wirkung in situ

Appliziert man Mäusen letale Pentalenolacton-Dosen, so tritt -zumeist nach mehreren Stunden- das für diese Tiere typische Bild eines schlechten Allgemeinzustandes in Erscheinung. Die Tiere hocken lethargisch am

Käfigboden und zeigen einen Buckel. Das Fell ist gesträubt, die Atmung erhöht und die Lidspalten sind stark verengt; die Reaktion auf äußere Reize ist drastisch eingeschränkt. Dann aber erkennt man deutliche Anzeichen einer hämolytischen Anämie. Der Urin ist im Anfangsstadium hellgrün und verfärbt sich dann über dunkelgrün und rot bis hin zu schwarz. Die Mäuse sterben in der Regel 2-3 Tage nach der Pl-Gabe. Eröffnet man die Tiere im späten Stadium der Erkrankung, so fällt zunächst die mehr oder weniger stark geschädigte Leber und die meist erheblich vergrößerte und schwarz gefärbte Gallenblase auf. Außerdem ist die Milz üblicherweise deutlich vergrößert. Diese deutlichen Anzeichen einer ausgeprägten Anämie werden auch durch die Hämatokrit-Werte auf drastische Weise unterstrichen, die im Endstadium bis auf etwa 1/3 des Normalwertes zurückgehen (Tab. II.2).

Versuchstiere	Hämatokrit ± SA	Anzahl der Best.
Kontrollen ohne Pl-Behandlung	45% ± 2,3	23
Mit letalen Pl-Dosen behandelte Tiere	16% ± 3,7	10

Tab. II.2: Bestimmung der Hämatokrit-Werte mit und ohne Pentalenolacton

3. Hemmung der GAP-DH - Aktivität in verschiedenen Organen und im Blut

Aufgrund der spezifischen Hemmaktivität von Pentalenolacton auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase sollten Aussagen über die Verteilung des Antibioticums im Organismus auf einfache Weise dadurch erreicht werden können, daß man die Enzymaktivitäten nach Pl-Gabe mit den Normalwerten aus den Organen vergleicht. Da solche Normalwerte für Mäuse in der Literatur nicht zugänglich waren, wurden zunächst die GAP-DH-Aktivitäten in verschiedenen Organen und im Blut von gesunden Tieren bestimmt. Es wurden dazu bis zu sieben Tiere verwendet, denen Blut und Organe wie beschrieben entnommen wurden. Man ersieht aus der Tabelle II.3 und aus Abb. II.1, daß die höchsten spezifischen Aktivitäten in Herz, Gehirn und Muskel auftreten. Andererseits beruht die geringe spe-

zifische Aktivität im Blut nicht auf einer sehr niedrigen Enzymaktivität, sondern vielmehr auf dem extrem hohen Proteinanteil. Tatsächlich findet man, wie zu erwarten, in den Erythrocyten vergleichsweise hohe Volumenaktivitäten, so daß die Hemmung durch Pentalenolacton meßtechnisch gut zu verfolgen ist.

Organ	Spezifische Aktivität	Anzahl der Tiere
Blut	0,060 U/mg	7
Leber	0,547 "	7
Milz	0,345 "	7
Niere	0,552 "	5
Herz	0,835 "	4
Muskel	1,986 "	3
Gehirn	0,896 "	3

Tab. II.3: Bestimmung der GAP-DH - Normalwerte in verschiedenen Organen

Bei dem im folgenden wiedergegebenen Versuch zur Bestimmung der durch Pentalenolacton hervorgerufenen Aktivitätsveränderungen wurden drei Mäuse verwendet, denen je eine letale Pl-Dosis von 150 µg intraperitoneal verabreicht wurde. Die Tiere wurden 1,5 h nach Pl-Gabe getötet, dann

Organ	Spezifische Aktivität	Anzahl der Tiere	% Hemmung
Blut	0,002 U/mg	3	97 %
Leber	0,142 "	3	74 %
Milz	0,117 "	3	66 %
Niere	0,063 "	3	89 %
Herz	0,494 "	3	41 %
Muskel	1,205 "	3	39 %
Gehirn	0,796 "	3	11 %

Tab. II.4: Bestimmung der GAP-DH - Aktivitäten nach Pl-Behandlung

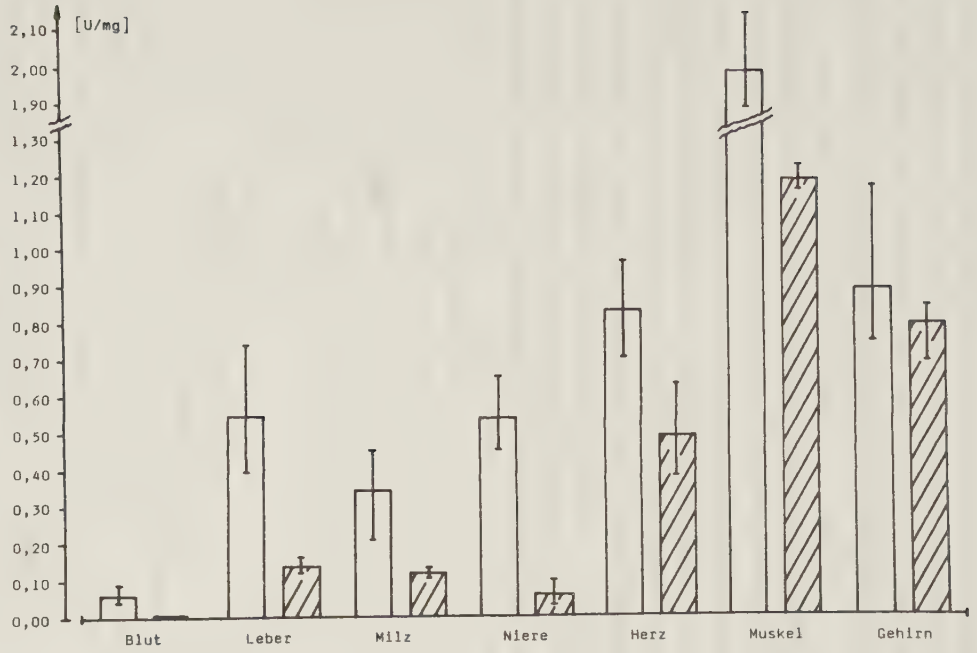


Abb. II.1: GAP-DH - Aktivitäten in Erythrocyten und in verschiedenen Organen unter Normalbedingungen (⊓) und 1,5 Stunden nach Pentalenolacton-Belastung (▨).

wurde das Blut und die Organe entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. Die zugehörige Tabelle gibt neben den spezifischen Aktivitäten auch den Grad der Enzymhemmung gegenüber den Normalwerten wieder. In der Abb. II.1 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt, wobei die Normalwerte und die nach Pl-Behandlung gefundenen Enzymaktivitäten direkt gegenüber gestellt wurden. Außerdem sind hier auch die jeweils gemessenen Extremwerte aufgeführt.
In ähnlichen Versuchen zeigte sich, daß die Hemmung der GAP-DH bei Gabe von letalen Pl-Dosen bereits 10 min. nach der Applikation ausgeprägt war.

4. Hemmung der GAP-DH - Aktivität in der Leber und in den Blutzellen bei Gabe von subletalen Pentalenolacton-Dosen

In Erweiterung des obigen Versuchs sollte hier exemplarisch an Leber- und Blutzellen gezeigt werden, ob auch mit subletalen Pl-Dosen eine Hemmung der GAP-DH eintritt, und nach welcher Zeit eine Regenerierung der Ausgangswerte erreicht wird. Es wurden dazu Tiere mit 50 µg Pl i.p. belastet, und nach verschiedenen Zeiten Blut und Leber zur Bestimmung der Enzymaktivität entnommen. Hier zeigte sich ebenfalls eine rasche Inaktivierung des Enzyms sowohl in Erythrocyten, als auch in den Leber-

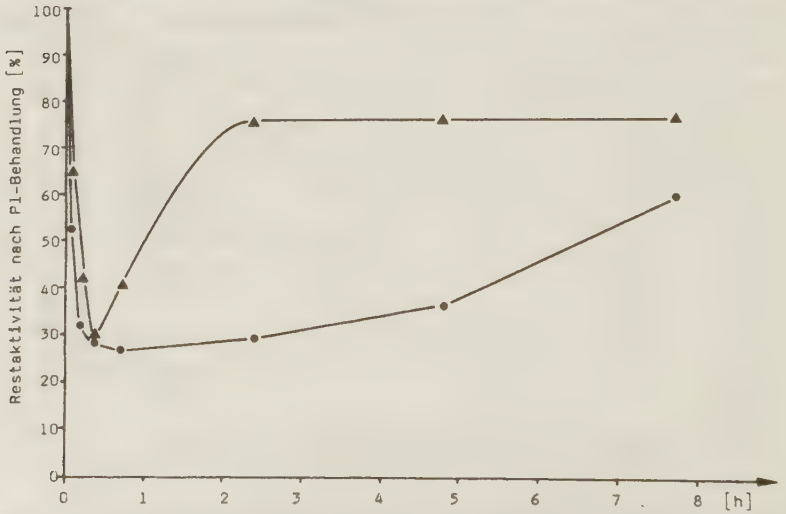


Abb. II.2: Zeitlicher Verlauf der GAP-DH - Aktivität in Erythrocyten (●) und in Leberzellen (▲) nach Gabe von subletalen Pl-Dosen

zellen (Abb. II.2). In der Leber wurden dabei zwischen 8 und 24 h nach Pl-Behandlung annähernd wieder "Normalaktivitäten" erreicht, während in Erythrocyten jedoch auch nach 78 Stunden erst etwa 60 % der normalen Aktivität auftrat. Vermutlich ist diese Differenz darauf zurückzuführen, daß die inaktivierte GAP-DH in den Hepatocyten im Zuge des Proteinturnovers ersetzt wird, während geschädigte Erythrocyten zugrunde gehen und neue GAP-DH nur bei der Erythropoese entsteht.

5. Nachweis von freiem Pentalenolacton im Blut, in der Leber und im Urin

Um zu sehen, wie lange aktives Pentalenolacton im Organismus verbleibt, wurde versucht, im Blut, in der Leber und im Urin freies Pl nachzuweisen. Dazu wurde das Serum und das Leberhomogenat mit Trichloressigsäure enteiweißt und der Überstand nach dem Abzentrifugieren neutralisiert. Diese Lösung wurde dann auf Pentalenolacton getestet (vergl. Anhang), wobei jedoch zu keiner Zeit nach Pl-Behandlung aktives Pentalenolacton nachzuweisen war. Diese Versuche wurden im Zeitraum von 10 min. bis zu mehreren Tagen nach Pl-Applikation durchgeführt. Um zu klären, ob durch die Enteiweißung Pentalenolacton inaktiviert wird, wurde die ganze Prozedur einerseits mit isoliertem Blut und parallel dazu auch mit Ringer-Lösung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß im heparinisierten Blut Pentalenolacton-Konzentrationen von mehr als 0,6 µg/ml eindeutig nachweisbar sind, allerdings beträgt die Wiederauffindungsrate im Mittel nur etwa 42 %. Daß dieser Verlust von über 50 % nicht auf das Enteiweissen zurückgeführt werden kann, bewies der Versuch mit Ringer-Lösung, wo im Mittel 82 % der eingesetzten Pl-Menge wiedergefunden wurden (Tab. II.5).

Appliziert man einer Maus von etwa 25 g Gewicht 100 µg Pl, so müßten bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von etwa 3 ml immerhin Konzentrationen von ca. 30 µg/ml auftreten, sofern alles Pl in den Kreislauf gelangt und dort in aktiver Form auftreten würde. Tatsächlich treten jedoch -wie der Versuch mit isoliertem Blut zeigt- weniger als 0,6 µg pro ml, d.h., weniger als 2 % dieser Menge frei im Blut auf. Andererseits ersieht man aus den GAP-DH - Versuchen, daß das Enzym in den Erythrocyten, im Vergleich mit den Zellen der anderen Organe, am stärksten inaktiviert wird.

Auf gleiche Weise wurde auch der Urin der Tiere untersucht, allerdings

a) in heparinis. Blut			b) in Ringer-Lösung		
eingesetzte Pl-Konz.	gemess. Pl-Konz.	Wiederfindungsrate in %	eingesetzte Pl-Konz.	gemess. Pl-Konz.	Wiederfindungsrate in %
0,31 µg/ml	-	0	0,45 µg/ml	0,34	76
0,63 "	0,22	35	0,90 "	0,70	78
1,26 "	0,48	38	1,80 "	1,80	60
3,14 "	0.83	26	4,50 "	3,75	83
6,29 "	3,60	57	9,00 "	7,50	83
12,57 "	5,20	41	18,00 "	17,50	97
31,43 "	13,50	43	45,00 "	47,00	104
62,86 "	36,00	57	-	-	-

Tab. II.5: Wiederfindungsrate von Pentalenolacton in heparinisiertem Blut und in Ringerlösung

ohne den Harn vorher zu enteiweißen. Doch auch hier konnte kein aktives Pl nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es wenig wahrscheinlich, daß freies und aktives Pentalenolacton im Kreislauf oder in den Organen in nennenswertem Umfang verbleibt. Die Frage nach dem Ausmaß einer möglicherweise stattfindenden Metabolisierung ließ sich in diesen Versuchsansätzen jedoch nicht klären, da bislang die Hemmung der GAP-DH das einzige sichere Nachweiskriterium für Pl darstellt (vergl. Anhang). Metabolisch umgewandeltes, inaktives Pl ist somit nicht mehr auffindbar.

6. Versuche mit radioaktiv markiertem Pentalenolacton

Für einige Versuchsansätze stand in begrenzter Menge tritiummarkiertes Pentalenolacton zur Verfügung. Mit Hilfe dieses radioaktiven Materials sollte nun versucht werden, weitere Aufschlüsse über den Verbleib des Pl's im Körper zu erhalten.

a) Nachweis im Blut und in verschiedenen Organen: Exemplarisch für verschiedene Versuche, die prinzipiell stets das gleiche Ergebnis zeigten, soll hier ein Versuchsprotokoll mit zwei Tieren wiedergegeben werden.

Den Mäusen wurde je 350 µg Pl (entsprechend 2 x 10^7 counts/min.) intravenös appliziert. Eineinhalb Stunden später wurden die Tiere getötet und Blut sowie Leber, Herz, Milz, Niere und Muskel entnommen. Von allen Organen wurden die Feuchtgewichte bestimmt, um auf die Gesamtorgane rückschließen zu können. Die Organe bzw. Organproben wurden mit HEPES-Medium zu je 1 ml aufgefüllt und wie oben angegeben homogenisiert und beschallt. Das Blut wurde 10 min. bei 800 x g zentrifugiert, dann wurden von den dicht gepackten Erythrocyten je 50 µl in 1 ml HEPES-Medium mit Triton-x-100 (1 %) lysiert. Nach dem Zentrifugieren wurden jeweils 2 x 200 µl der klaren Überstände entnommen und zur Auszählung in Szintillations-Gläschen überführt. Zu einer dieser beiden Reihen wurde direkt je 5 ml Szintillator-Mix zugesetzt, während zu der anderen Reihe zunächst je 20 µl H_2O_2 zugesetzt und über Nacht inkubiert wurde. Ein Vergleich beider Reihen zeigte jedoch nie signifikante Unterschiede, doch lag die Zählausbeute bei den mit Perhydrol behandelten Proben stets geringfügig höher.

Wie die nachfolgend wiedergegebenen Zählausbeuten zeigen (Tab. II.6), treten die höchsten Pl-Konzentrationen im Blut und in der Niere auf; an dritter Stelle folgt die Leber. Die Ergebnisse korrelieren insgesamt sehr gut mit den Enzymhemmungen, die in den einzelnen Organen gemessen wurden. Allerdings konnten in den Erythrocyten nur relativ geringe Pl-Mengen gefunden werden, obwohl diese Zellen offensichtlich am stärksten

Organ	cpm/ml	g Feuchtgew./ml	cpm/g Feuchtgew.
Serum	106 045	-	-
Erythrocyten	33 800	-	-
Leber	40 918	0,449	91 200
Milz	9 898	0,146	67 948
Niere	29 743	0,203	146 754
Herz	7 378	0,161	46 644
Muskel	8 640	0,119	75 212

Tab. II.6: Verteilung von radioaktiv markiertem Pentalenoalcton in verschiedenen Organen

betroffen sind. Der Grund für diesen Befund ist aber sicher in der Lyse der Erythrocyten nach Pl-Behandlung zu suchen, wodurch dann primär der Serumanteil an radioaktivem Pl erhöht wird. In wieweit Pentalenolacton unspezifisch an Serumproteine und Membranbestandteile gebunden wird, läßt sich aus diesen Versuchen nicht ableiten.
Aus den so erhaltenen Werten wurde nun auf das Gesamttier umgerechnet, um zumindest grob abschätzen zu können, wieviel Prozent der insgesamt eingesetzten Pl-Menge in den einzelnen Organen wiedergefunden werden kann (Tab. II.7). Im Fall der Organe läßt sich dabei ziemlich verläßlich hochrechnen, da ihre Gesamtmasse bestimmt wurde. Für die im Organismus auftretende Gesamt-Blutmenge und -Muskelmasse ist man hingegen auf

Organ	cpm/Organ	Anteil von der eingesetzten pl-Menge
Blut	274 788	1,37 %
Leber	228 000	1,14 %
Milz	9 898	0,05 %
Niere	29 743	0,15 % ≙ 0,30 %
Herz	7 378	0,04 %
Muskel	75 212	0,38 %

Tab. II.7: Wiederfindungsrate von radioaktiv markiertem Pentalenolacton in verschiedenen Organen 1,5 h nach Applikation von 350 µg Pl.

Schätzwerte aus der Literatur angewiesen, die für eine bloße Übersicht aber hinreichend genau sind. Die gesamte Blutmenge wurde so zu 3 ml angenommen, wobei der Hämatokrit-Wert im vorliegenden Fall etwa 20 % betrug. Für die Muskelmasse wurde 1 g berechnet, was 4 % des Körpergewichtes entspricht. Die in der Tabelle angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die insgesamt eingesetzten 2×10^7 cpm.
Man ersieht aus den hier ausgeführten Ergebnissen, daß kaum mehr als 3 % der eingesetzten Pl-Menge wiedergefunden werden kann. Natürlich sind derartige Hochrechnungen stets mit einigen Unwägbarkeiten belastet, so daß die errechneten Zahlenwerte in jedem Fall nur approximativen Charakter haben. Doch selbst bei großzügigster Kalkulation und maximaler angenommener Fehlerbreite geht der in den beschriebenen Organen und im Blut

wiedergefundene Pl-Anteil wohl nicht über 5 % der eingesetzten Menge hinaus. Freilich wurden bei dieser Betrachtung einige Organe und Gewebe außer Acht gelassen, doch wurden -zumal wenn man die bei der GAP-DH - Messung im Gehirn gefundenen Ergebnisse berücksichtigt- die gut durchbluteten und funktionell wichtigsten Organe kontrolliert. So erscheint es durchaus unwahrscheinlich, daß in dem nicht berücksichtigten Anteil des Gesamtorganismus erhebliche Mengen Pentalenolactons gespeichert werden. Das führt zu der Schlußfolgerung, daß sich 1,5 Stunden nach Applikation von 350 µg Pl nicht mehr als maximal 5-10 % dieser Dosis noch im Körper befinden.

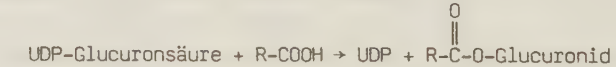
b) Nachweis im Urin: Wie bereits dargestellt, findet sich im Urin von Mäusen, die mit Pl belastet wurden, keine Pl-Aktivität. Experimente mit radioaktiv markiertem Pentalenolacton sollten nun zeigen, ob das Antibioticum nach metabolischer Umwandlung in inaktiver Form über den Urin ausgeschieden wird. Bei dem nachfolgend beschriebenen Versuchsprotokoll wurden drei Tiere verwendet, denen je 175 µg Pl (≙ 35 µCi) intravenös gespritzt wurde. Unmittelbar vor Pl-Applikation und dann nach 10, 30, 60, 90 und 120 min. wurde jeweils Urin abgepreßt, wovon dann 15 µl mit

Versuchstier	0 min.	10 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
I	13	324 146	226 670	102 747	55 959	51 956
II	14	92 422	331 742	308 891	170 948	120 012
III	8	524 158	311 296	169 706	45 957	39 792

Versuchstier	Gesamt-Zählausbeute	Anteil von der Gesamtmenge
I	761 477	7,64 %
II	1 024 014	10,27%
III	1 090 908	10,94 %

Tab. II.8: Nachweis von radioaktiv markiertem Pentalenolacton im Urin. Zählausbeuten in counts/min.

je 5 ml Szintillator-Mix versetzt und im LSC ausgezählt wurden.
Die pro Tier insgesamt eingesetzte Pl-Menge lieferte 9 975 000 cpm. Man ersieht aus der Zusammenstellung, daß erhebliche Mengen radioaktiv markierten Pl's im Urin erscheinen, und daß dieser Ausscheidungsprozeß bereits nach 10 min. eingesetzt hat. Der Anteil an Radioaktivität, der innerhalb von zwei Stunden in den ausgewerteten Urinproben auftrat, macht im Mittel etwa 10 % von der insgesamt eingesetzten Pl-Dosis aus. Die Gesamtmenge des in dieser Zeit produzierten Urins, der aus technischen Gründen nicht quantitativ gesammelt werden konnte, beträgt aber ein mehrfaches der ausgewerteten Proben.
Auch in diesem Versuch wurde wiederum Urin im GAP-DH - Test eingesetzt, um auf mögliche Hemmaktivität zu testen. Dazu wurden 10 µl Harn direkt zum Testansatz zugesetzt, eine Hemmwirkung auf das Kaninchenmuskel-Enzym trat dabei aber nicht ein. Im gleichen Test führten jedoch 20 µl einer 1 : 10 000 Verdünnung der Pl-Stammlösung (5 mg/ml) zu einer 50 %igen Hemmung von Kaninchenmuskel - GAP-DH (vergl. Anhang). Das entspricht umgerechnet einer Konzentration von 0,010 µg Pl im Testansatz. Im Urin befinden sich aufgrund der Zählraten nach 10 min. etwa 5 µg Pl in 15 µl Harn. Da hiervon 10 µl in den Test eingesetzt wurden, entspricht das einer Pl-Menge von ca. 3 µg.
Diese Ergebnisse belegen, daß das Antibioticum im Organismus zum überwiegenden Teil metabolisch inaktiviert und harnpflichtig ausgeschieden wird. Aufgrund des stark hydrophoben Charakters von Pentalenolacton ist es sehr wahrscheinlich, daß das Antibioticum in der Leber in eine gut wasserlösliche Form, etwa in ein Glucuronid überführt wird. Bekanntermaßen erfolgen derartige Konjugationen in der Regel an einer Alkohol- bzw. Säuregruppe des Aglycons. Im Fall des Pentalenolactons käme für eine solche Glucuronidierungsreaktion wohl vornehmlich die Carboxylgruppe in Betracht, nach dem allgemeinen Schema:



Interessanterweise ist ein ähnliches Glucuronid kürzlich in der Literatur beschrieben worden (41). Die Autoren isolierten die Verbindung aus Kulturfiltraten von Streptomyceten, wo es gemeinsam mit anderen Pl-Formen auftrat. Die Struktur wurde mittels ^{13}C-NMR identifiziert,im biolo-

gischen Hemmtest mit Procaryonten war die Verbindung inaktiv.

7. Diskussion

In den in situ - Versuchen mit Pentalenolacton zeigte sich sehr rasch die hohe Toxizität der Verbindung, die für den Inhibitor einer so zentralen Stoffwechselleistung wie der Glykolyse aber natürlich zu erwarten war. Da Pentalenoalcton am Ganztier von vornherein nur wenig geeignet erschien, wurden die hier genannten Versuche nicht zum Selbstzweck durchgeführt, vielmehr sollten damit die Grundlagen für spätere Untersuchungen mit Parasiten und Tumorzellen unter in situ - Bedingungen geschaffen werden. Darüber hinaus sollte aber auch das metabolische Schicksal von Pentalenolacton, zumindest ansatzweise, geklärt werden.
Im Einzelnen zeigte sich, daß mit Pentalenolacton-Konzentrationen von etwa 100 µg pro Tier die Letaldosis für Mäuse erreicht ist. Am schwersten wiegt wohl dabei eine toxische hämolytische Anämie, die durch allgemeine Symptome, wie Blässe der Haut (was an den Extremitäten und an den Ohransätzen gut zu erkennen ist) und Tachykardie, insbesondere aber auch durch das Blutbild, dem stark verminderten Hämatokrit-Wert sowie durch die charakteristische Verfärbung des Urins sichtbar wird. Vermutlich ist diese zumeist foudroyant verlaufende hämolytische Krise auch in erster Linie für den Tod der Tiere verantwortlich. Als Hinweis darauf kann auch gelten, daß nach Behandlung von Mäusen mit subletalen Dosen zunächst eine Anämie in Erscheinung tritt, die aber rasch zurückgeht. Darüber hinaus zeigen diese Tiere keinerlei Anzeichen, die auf eine Schädigung des Organismus´s schließen lassen.
Ein Vergleich der Enzymaktivitäten (GAP-DH) in verschiedenen Geweben und Organen zeigt, daß -nach Pl-Belastung- nur in der Niere vergleichbar drastische Hemmwirkungen auf das Enzym zu beobachten sind, wie im Blut. Hier hat die Inaktivierung der GAP-DH - Aktivität zwei Konsequenzen. Zum einen sind die Zellen im Bereich des inneren Nierenmarks im Energiestoffwechsel vollständig auf eine funktionierende Glykolyse angewiesen, da diese Zellen keine Mitochondrien und somit keine Atmungskette besitzen. Darüber hinaus ist aber auch die Gluconeogenese-Leistung der Nieren für die Lactat-Rückresorption und für den Säuren- und Basen-Haushalt von Bedeutung. Es ist darum zu vermuten, daß die Nierenfunktion insgesamt durch eine mehr als 80 %ige Hemmung der GAP-DH erheblich beein-

flußt wird. Das Ausmaß dieser Schädigung und die dadurch bedingte Belastung für den Gesamtorganismus ist aus den vorliegenden Versuchen jedoch nicht zu ersehen.

Hingegen scheinen die Leberfunktionen durch Pentalenolacton nicht wesentlich beeinflußt zu werden. Zwar tritt auch hier eine Hemmung der GAP-DH von über 60 % auf, doch sind diese Zellen in ihrem Energiestoffwechsel nicht auf die Glykolyse angewiesen, da Citratcyclus und Atmungskette gut ausgeprägt sind und verwertbare Substrate in genügender Menge anfallen und nicht über die Glykolyse bereitgestellt werden müssen. Auch die Einschränkung der Gluconeogenese dürfte unter normalen Ernährungsbedingungen ohne schwerwiegende Konsequenzen bleiben, da diese Stoffwechselleistung der Leber zur Glucose-Homöostase im Fasten dient. So zeigte sich auch an primären Hepatocyten-Kulturen, daß durch Pentalenolacton offensichtlich keine Zellschädigung erfolgt (vergl. Kap. III). Morphologische Veränderungen der Leber, wie sie in situ nach Pl-Behandlung auftraten, sind somit in erster Linie Begleiterscheinungen der Hämolyse und der damit einhergehenden suboptimalen Sauerstoffversorgung des Organs.

Muskel, Herzmuskel und Milz werden nicht soweit geschädigt, daß eine für das Tier bedrohliche Funktionseinbuße in Erscheinung treten könnte. Die häufig zu beobachtende Milzvergrößerung ist ebenfalls eine charakteristische Begleiterscheinung der hämolytischen Anämie.

Interessanterweise tritt im Gehirn eine allenfalls geringfügige Beeinträchtigung der GAP-DH - Aktivität von etwa 10 % auf. Da für diese Zellen Glucose das Hauptenergie-Substrat darstellt, das über die aerobe Glykolyse zu CO_2 oxidiert wird, würde eine Enzymhemmung, wie sie in den Erythrocyten und in den Nierenzellen stattfindet, sicher den sehr raschen Tod der Tiere bedeuten. Wie in in vitro - Versuchen mit Rohextrakt gezeigt werden konnte, ist die Sensibilität der GAP-DH aus Gehirn gegenüber Pentalenolacton aber ebenso groß wie die des Kaninchenmuskel-Enzyms. Die Blut-Hirn-Schranke scheint also für Pl nicht oder nur in sehr geringem Maße passierbar zu sein.

Wie die Versuche mit radioaktiv markiertem Pentalenolacton zeigten, beginnt innerhalb der ersten 10 min. nach Pl-Gabe die metabolische Inaktivierung des Antibioticums und deren Ausscheidung über den Harn.

III. Wirkungsweise von Pentalenolacton auf verschiedene Eukaryonten-Zellsysteme

A. Einleitung

Es existiert eine ganze Reihe von Substraten, die auf verschiedene Enzyme der Glykolyse hemmend wirken. So inhibiert Fluor die Enolase und Fluoropyruvat sowie Oxamsäure ($H_2N \cdot CO \cdot COOH$) die Lactatdehydrogenase (52, 67). Jodessigsäure, Jodacetamid sowie Chlormercuribenzoat und Threose-2,4-Bisphosphat hemmen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (14, 35, 43). Arsenat schließlich wirkt als Entkoppler der Substratketten-Phosphorylierung, da es in der GAP-DH - Reaktion anstelle von anorganischem Phosphat eingebaut wird.Das entstehende 1-Arsenato-3-Phosphoglycerat hydrolysiert jedoch spontan zu 3-Phosphoglycerat, so daß auf der Stufe der Phosphoglycerat-Kinase kein ATP gebildet wird (dieser Mechanismus wurde auch zur GAP-DH - Bestimmung ausgenutzt, da so die Rückreaktion verhindert werden kann). All diese Substanzen sind jedoch für einen Einsatz unter in vivo - Bedingungen ungeeignet, da sie entweder als Substrate metabolisiert werden (Threose-2,4-Biphosphat, Oxamsäure), oder als "SH-Reagentien" so unspezifisch wirken, daß sie einen komplexen Zellstoffwechsel auf undefinierbare Weise belasten (43). Insofern sind spezifische Glykolyse-Inhibitoren bislang nicht zugänglich, obwohl die selektive Inhibierung der Glykolyse in vielen Fällen sehr wünschenswert wäre. Pentalenolacton könnte diese Lücke schließen, sofern es unter in vivo - Bedingungen in die Zellen aufgenommen wird und neben der GAP-DH - Hemmung nicht auch auf andere Stoffwechselleistungen des komplexen Zell-Geschehens einwirkt.
Wie Versuche mit Mikroorganismen (12, 15) und meine Arbeiten mit verschiedenen Eukaryonten-Zellsuspensionen (10, 11) gezeigt haben, stellt der Eintransport von Pentalenolacton in die Zellen kein großes Problem dar, und auch aus theoretischen Überlegungen ist zu fordern, daß ein kleines Molekül mit einem relativ hohen lipophilen Anteil mehr oder weniger gut membrangängig sein sollte. Tatsächlich ist bislang nur ein Fall bekannt geworden, bei dem Pl offenbar nicht in die Zellen aufgenommen wurde, und zwar bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae; allerdings auch hier nur unter Bedingungen, wo die Zellen eine rigide Zellwand aufbauen

(Acetat-Medium). Unter "Normalbedingungen", d.h., mit fermentierbaren Zuckern als C-Quelle, tritt jedoch ebenfalls eine intrazelluläre GAP-DH-Hemmung auf (2, 11).
Für die selektive Hemmwirkung des Pentalenolactons auf die GAP-DH sprachen zwei Ergebnisse: Zum einen war von S. Hartmann ein Spektrum von Enzymen des Intermediärstoffwechsels getestet worden, wobei -mit Pl-Konzentrationen, durch die die GAP-DH in beiden Testrichtungen (Glykolyse und Gluconeogenese) total gehemmt wird- keine, bzw. nur eine leichte Hemmwirkung auftraten (17). Die Liste der getesteten Enzyme ist neuerdings noch von D. Zdunek im Rahmen seiner Dorkorarbeit um eine erhebliche Anzahl (insbesondere um NAD-abhängige Dehydrogenasen) erweitert worden, wobei ebenfalls keine signifikanten Hemmungen auftraten. Der zweite Hinweis für die spezifische Hemmung der GAP-DH durch Pl stammt aus Versuchen mit den Bakterien Bacillus subtilis und Escherichia coli. Bei diesen Organismen trat Wachstumshemmung und schließlich Lyse ein, sofern die Zellen auf Minimalmedium mit solchen Zuckern als einziger C-Quelle angezogen wurden, die glykolytisch abgebaut werden müssen (Glucose, Fructose, Glycerin etc.). Fütterte man dann aber C-Quellen zu, die nicht glykolytisch umgesetzt werden (Pyruvat, Malat, Prolin etc.), so konnte die Hemmung aufgehoben werden und das Zellwachstum lief wieder an (17, 24).

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden nun Eukaryonten-Zelltypen ausgesucht, die entweder vollständig auf die Glykolyse angewiesen sind, da sie diesen Stoffwechselweg zur Deckung ihrer Energiebilanz benötigen (Erythrocyten), oder vollständig unabhängig davon leben können, sofern sie nicht-glykolyse-pflichtige C-Quellen und Glucose enthalten (Hepatocyten). Für die letztgenannten Untersuchungen waren in vitro - Kulturen unerläßlich, da nur sie die Möglichkeit bieten, die Qualität der Zellen über mehrere Tage hin kontrollieren zu können. Darüber hinaus sollten auch Tumor-Zellen getestet werden, denn bekanntlich ist eine erhöhte Glykolyse-Rate ein weit verbreitetes Phänomen cancerogen entarteter Zellen. Obgleich sich die einst von O. Warburg vertretene Hypothese, die aerobe Glykolyse sei das grundlegende Charakteristicum von Tumor-Zellen (76), in dieser Form als nicht stichhaltig erwiesen hat (77), ist bislang kein generelles Konzept zur Erklärung dieses Phänomens bekannt. Es wurden Ehrlich Ascites Tumor Zellen gewählt, da diese Zellen

leicht zu halten und zu kultivieren sind, und weil zudem eine große Anzahl experimenteller Daten über diesen Zelltyp bereits vorliegt, so daß die gefundenen Ergebnisse damit verglichen werden konnten. Außerdem unterliegen EAT-Zellen dem Crabtree-Effekt, der 1925 erstmals von Cori und Cori (54, 55) beschrieben und 1929 von H.G. Crabtree genauer untersucht worden ist (56, vergl. auch 60). Dabei handelt es sich um eine Inhibierung der Zellatmung in Gegenwart von Glucose, so daß quasi ein umgekehrter Pasteur-Effekt resultiert. Als Mechanismus dieses Effektes wird angenommen, daß zwischen der Glykolyse und der Atmung eine Konkurrenz um das vorhandene ADP stattfindet, wobei in Anwesenheit von Glucose -bzw. einer Hexose, die durch die Hexokinase phosphoryliert werden kann- die Glykolyse bevorzugt abläuft (47). Bekannterweise beruht der Pasteur-Effekt großenteils auf einer allosterischen Hemmung insbesondere der Phosphofruktokinase, aber auch der Hexokinase und der Pyruvat-Kinase durch ATP. Für Ehrlich Ascites Zellen konnten M. Gosalves et al. jedoch zeigen, da die allosterische Regulation auf der Stufe der Pyruvat-Kinase nicht existiert, da das EATC-Enzym weder in vivo, noch in vitro auf ATP anspricht (57, 58). Hingegen ist die Fähigkeit zur endogenen Atmung in diesen Zellen nicht behindert, wie die Arbeiten von L. Lehninger gezeigt haben (74). Auch läßt sich die Atmung durch Einsatz von Entkoppler-Substanzen, die sowohl auf der Stufe der Substratketten-Phosphorylierung (Arsenat), als auch auf der Stufe der Atmungsketten-Phosphorylierung (2,4 Dinitrophenol, Dicumarol u. a.) wirken, steigern (72).
Aus diesem Grunde sollten EAT-Zellen in der Lage sein, den durch Pentalenolacton in der Glykolyse gesetzten Block durch eine vermehrte Atmungsaktivität zu kompensieren.
Darüber hinaus wurden einige wenige Versuche auch mit Plasmodium vinckei (dem Erreger einer experimentellen Nagetier-Malaria) durchgeführt, allerdings nicht um ausgeprägte Stoffwechsel-Untersuchungen an diesen Parasiten durchzuführen, sondern vielmehr, um zu zeigen, ob unter in situ - Bedingungen eine Pl-spezifische Beeinflussung des Parasitämie-Verlaufes eintritt. Bekanntlich vermehren sich Plasmodien intrazellulär in Erythrocyten.
Da humanpathogene Plasmodien nicht auf Labortiere übertragbar sind, wurden für Untersuchungen mit Plasmodium falciparum in vitro - Kulturen dieser Spezies verwendet.

B. Spezielle Methoden

1. Zellisolierungs- und Kultivierungstechniken

a) Erythrocyten: Die Isolierung der Erythrocyten wurde wie in Kap.II beschrieben durchgeführt. Nach dem Zentrifugieren und Waschen der Zellen wurden sie in den jeweiligen Medien aufgenommen und für den Versuch im Brutschrank bei 37°C und 60 rpm inkubiert.

b) Hepatocyten: Zellisolierung: Zur Isolierung der Hepatocyten kam stets ein Perfusionssystem mit Collagenase zur Anwendung, das von Berry und Friend (78) entwickelt, von Ingebretsen und Wagle (85) modifiziert und schließlich von R. Gebhardt und G. Schirmer (79, 83, 93) an sterile Bedingungen angepaßt wurde. Für die Präparation wurden Ratten verwendet, die mit Nembutal® (60 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert worden waren. Die Leber wurde von der Pfortaderseite her -zunächst in einem offenen System- mit Präperfusionsmedium (Ca^{2+}-frei, mit EGTA) perfundiert und unter diesen Bedingungen freipräpariert. Die Technik der Organentnahme ist ausführlich bei Schirmer (93) beschrieben. Unmittelbar nach der Isolierung wurde die Leber in eine Perfusionsapparatur überführt und in einem nunmehr geschlossenen Kreislauf mit Perfusionsmedium durchströmt. Nach einer kurzen Adaptationszeit wurde diesem Medium Collagenase-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 30 mg/80 ml und $CaCl_2$ zu einer Endkonzentration von 1 mM supplementiert. Das Ende der Perfusion war erreicht, wenn die Leber ein rissiges Aussehen zeigte und bei leichtem Druck charakteristische Zerfallserscheinungen auftraten. Das Organ wurde in ein Becherglas mit 50 ml Isolierungsmedium (O_2 - gesättigt) überführt, wo die äußere Bindegewebshülle zerschnitten wurde, so daß die durch Collagenase-Behandlung aus dem Zellverband herausgelösten Zellen durch "Ausschütteln" der Gewebsreste ins Medium gelangten. Diese Zellsuspension wurde durch zwei Lagen Verbandmull und durch ein Polyamid-Maschengewebe mit einer Porenweite von 100 µm filtriert, um Gewebsreste und Zellklumpen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen einer differentiellen Zentrifugation unterworfen (3 min. bei 100 x g, 4 min. bei 50 x g und zweimal 4 min. bei 30 x g), um Nichtparenchymzellen und Zelltrümmer abzutrennen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die

Hepatocyten dann in einem definierten Volumen Isolierungsmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellausbeute und des Vitalitätsindexes wurde ein Aliquot der Suspension entnommen, mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Bei üblichen Präparationen betrug die Hepatocyten-Ausbeute ca. 3-5 x 10^8 Zellen, der Vitalitätsindex lag bei etwa 90 %. Nach dem Auszählen wurden die Hepatocyten nochmals zentrifugiert und dann in Kultivierungsmedium (für diese Versuche W/AB 77) aufgenommen, wobei eine Zelldichte von 1,25 x 10^6 Zellen/ml eingestellt wurde.

Zellkultivierung: Die Kultivierung der Hepatocyten erfolgte für diese Versuchsansätze stets in viersegmentigen Petrischalen, die zuvor zur besseren Anheftung der Zellen mit Kollagen beschichtet worden waren (83). Pro Segment wurden jeweils 1,5 ml homogene Zellsuspension ausgesät und zum Absetzen der Zellen im Brutschrank bei 37°C und einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Nachdem sich die vitalen Hepatocyten abgesetzt und teilweise ausgebreitet hatten (nach etwa 3-5 Stunden), wurde der erste Medienwechsel durchgeführt, wobei auch die nichtabgesetzten Zellen aus den Kulturen entfernt wurden. Die weiteren Medienwechsel erfolgten dann im Turnus von 24 Stunden.

c) Ehrlich Ascites Tumor Zellen: Anzucht und Gewinnung der Zellen: Zur Anzucht der Zellen im Peritoneum von Mäusen wurden entweder Stabilate oder aber unverdünnte Ascites-Zellsuspension von einem infizierten Spendertier verwendet. Den Tieren wurden dabei jeweils 400 µl EATC-Suspension intraperitoneal gespritzt. (Das Anlegen von Stabilaten erfolgte nach der für Trypanosomen angegebenen Methode.)
Zum Ernten der Zellen, insbesondere, wenn in vitro - Kulturen daraus angelegt werden sollten, wurden die Tiere drei Tage nach der Infektion getötet. Das Bauchfell wurde nun mittels zweier chirurgischer Pinzetten aufgerissen, so daß die Ascites-Suspension durch Punktion der Bauchhöhle steril entnommen werden konnte. Für Versuche mit Zellsuspensionen, wo eine möglichst hohe Zellausbeute erwünscht war, wurde die Bauchhöhle noch zweimal mit isotoner Salzlösung ausgespült. Zur Zellisolierung wurden die Suspensionen mehrerer Tiere vereinigt und 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit HEPES-Medium gewaschen und schließlich in einem definierten Volumen HEPES-Medium aufgenommen. Nach

der Bestimmung der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer wurde dann die jeweils gewünschte Zelldichte (zumeist 1 x 10^8 EATC/ml) eingestellt.
Zellkultivierung: Ehrlich Ascites Tumor Zellen wachsen in in vitro - Kulturen submers. Für diese Kulturen wurden Glasflaschen mit einem Nennvolumen von 250 ml verwendet. Um zu vermeiden, daß an der Grenzschicht zwischen Mediumoberfläche und Glaswand vermehrtes Zellwachstum stattfindet, wurden die Flaschen vor Versuchsbeginn stets 1 h mit Chromschwefelsäure vorbehandelt und nach dem Spülen mit Aqua dest. autoklaviert. Anschließend wurde in die Flaschen je 50 ml Kultivierungsmedium mit Pferdeserum (15 %) eingefüllt und soviel frisch entnommene Ascites-Zellsuspension zugesetzt, daß eine Zelldichte von ca. 1 x 10^5 EATC/ml vorlag.

d) Plasmodium vinckei: Zur Infektion von Mäusen mit Pl. vinckei wurde den Tieren 100 µl infiziertes Blut eines Spendertieres (1:1 mit Sucrose-Citrat verdünnt) bzw. Stabilat i.p. gespritzt. Der Verlauf der Parasitaemie ist von einer progressiv fortschreitenden Anämie begleitet,und ließ sich darum am Urin der Tiere verfolgen (vergl. Pl-Wirkung in situ). Die Tiere starben unbeeinflußt üblicherweise 4-7 Tage post infektionem. Um den genauen Parasitaemie-Verlauf zu bestimmen, wurde allerdings der Anteil der infizierten Erythrocyten im nach Giemsa gefärbten Ausstrich bestimmt. Dazu wurde mehrfach das gesamte Gesichtsfeld ausgezählt und der Anteil von infizierten zu gesunden Erythrocyten bestimmt. Um gut auswertbare Ergebnisse zu erhalten, sollte die Gesamtzahl pro Gesichtsfeld etwa 100-200 Zellen betragen. Die Einstellung dieser Zellzahl bei verschieden dichten Ausstrichen erfolgt über einen geeigneten Objektivwechsel.
Auf die Isolierung von infizierten Erythrocyten und von Plasmodien wurde verzichtet, da ich entsprechende Messungen bereits in meiner Diplomarbeit ausgeführt habe. Dort findet sich auch eine methodische Beschreibung zu diesem Problem (10).

e) In vitro - Kulturen von Plasmodium falciparum: Da lebende Plasmodien notwendig auf ihre Wirtszelle angewiesen sind, lassen sich in vitro - Kulturen nur dann einrichten, wenn (bei Pl. falciparum) Human-Erythrocyten und Human-Serum anwesend sind. Als Medium wird üblicherweise

RMPI-1640 verwendet, wobei Trockenmedien eingesetzt werden sollten, da kurioserweise stets Schwierigkeiten auftreten, wenn Flüssigkonzentrate verwendet werden (97). Zur Kultivierung wurde dem RPMI-Medium Glutamin, $NaHCO_3$ und HEPES (20 mM) sowie 10 % Human-Serum zugesetzt und mit Erythrocyten ein Hämatokrit von 5 % eingestellt. Das Gesamtvol. betrug 10 ml. Zur Infektion wurden diesem Ansatz 20 % Erythrocyten (bezogen auf die bereits vorhandene Zelldichte) aus einer hoch infizierten Kultur zugesetzt. Rechnerisch ergibt sich somit ein Hämatokrit von 6 % mit einer Infektionsrate von 1,7 %. Die Kultivierung erfolgt zweckmäßig in einer Petrischale. Zur Inkubation wurden die Petrischalen in einen Exsikkator gestellt, der seinerseits in einem Brutschrank bei 37°C untergebracht war. Durch diese Anordnung wurde es leicht möglich, den Sauerstoff-Anteil im geschlossenen Exsikkator auf den zur Kultivierung erforderlichen Anteil von 5 %-18 % zu senken: Nachdem die Kulturen eingebracht worden waren, wurden zwei handelsübliche Teelichte im Exsikkator angezündet und dieser verschlossen. Die Kerzen verlöschen, wenn der Sauerstoffanteil genügend gesunken ist ("candle jar" (99)). Die Erythrocyten setzten sich in den Kulturschalen ab, so daß man zum Medienwechsel das überstehende Medium absaugen und durch neues ersetzen kann. Ein Medienwechsel ist täglich erforderlich.
Zur Bestimmung der Parasitaemie wurden Giemsa-gefärbte Ausstriche angefertigt und wie oben beschrieben ausgezählt. Die Parasitaemie nahm in der Regel bis zum 4. oder 5. Versuchstag kontinuierlich auf schließlich etwa 10 % zu. Zu diesem Zeitpunkt muß man die Kulturen spätestens splitten, d.h., zur Infektion frischer Kulturen verwenden, da sie sonst zugrunde gehen.

C. Ergebnisse

1. Wirkung von Pentalenolacton auf Erythrocyten

Um die Wirkung von Pentalenolacton auf Erythrocyten zu untersuchen, wurden die Zellen unter in situ - Bedingungen und im isolierten Zustand in Suspension beobachtet. Auf Messungen in in vitro - Kulturen wurde hingegen verzichtet, da solche Kulturen aufgrund des bekanntlich stark eingeschränkten Erythrocyten-Stoffwechsels -die Zellen sind nicht teilungsfähig, da kein Zellkern vorhanden ist, und sie besitzen keine

Atmungsketten-Enzyme, da die Mitochondrien fehlen- keine zusätzlichen Informationen hätten liefern können.

Dieser definiert eingeschränkte Stoffwechsel der Erythrocyten ermöglicht aber andererseits Voraussagen über die Pl-Wirkung, sofern Pentalenolacton die beschriebenen Eigenschaften besitzt. So ist zu fordern, daß nach Pl-Zugabe eine rasche Inaktivierung der GAP-DH eintritt, wenn Pentalenolacton gut membrangängig ist. Außerdem sollte in einer gegebenen Erythrocyten-Population nach einmaliger Pl-Gabe keine Reaktivierung der GAP-DH auftreten, wenn Pl tatsächlich irreversibel an das Enzym gebunden wird, wofür starke Evidenzen bestehen (17). Desweiteren müßte durch Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase die Bildung von Lactat eingeschränkt bzw. vollständig aufgehoben werden. Da die Glykolyse für Erythrocyten die einzige Form der Energiegewinnung darstellt, muß als Folge des Blocks auf der Stufe der GAP-DH eine Verarmung an ATP auftreten, sobald vorhandene Energiereserven aufgebraucht sind. ATP wird in diesen Zellen in erster Linie zur Erhaltung der Membranstruktur und des Ionengradienten benötigt, so daß bei Abnahme des ATP-Levels mit einer letalen Zellschädigung (Hämolyse) zu rechnen ist. Es ist bekannt, daß Erythrocyten durch die Bisphosphoglycerat-Mutase in der Lage sind, 1,3-Bisphosphoglycerat in 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) umzuwandeln. Dieses 2,3-BPG unterstützt primär die Freisetzung des Sauerstoffs im Gewebe, doch kann es durch ein weiteres Enzym, die Bisphosphoglycerat-Phosphorylase (Bildung von 3-Phosphoglycerat) erneut in die Glykolyse eingeschleust werden, wobei pro Mol 2,3-BPG ein Mol ATP gebildet werden kann. Da der Intrazelluläre Pool an 2,3-BPG relativ hoch ist -4,5 mmolar in menschlichen Erythrocyten-, kann es durchaus als erhebliche Energiereserve betrachtet werden. Da 2,3-BPG unterhalb des GAP-DH-Schrittes in die Glykolyse einmündet, sollte durch Pl keine spontane Hämolyse ausgelöst werden.

Wie die Untersuchungen unter in situ - Bedingungen gezeigt haben,wird Pentalenolacton sehr rasch metabolisch inaktiviert und harnpflichtig ausgeschieden. Dennoch erfolgt nach etwa 24 h eine massive hämolytische Krise, die bei subletalen Dosen an Pl durch Erythropoese überwunden werden kann, während sie bei letalen Pl-Mengen zum Tode führt. In jedem Fall werden aber die betroffenen Erythrocyten offenkundig irreversibel geschädigt (vergl. Kap. II).

Abbildung III.1 zeigt die Inaktivierungskinetik der GAP-DH in Erythrocyten nach intravenöser Gabe einer letalen Dosis von 200 µg Pentalenolacton. Dazu wurde einer Maus zu den angegebenen Zeiten jeweils 5 µl

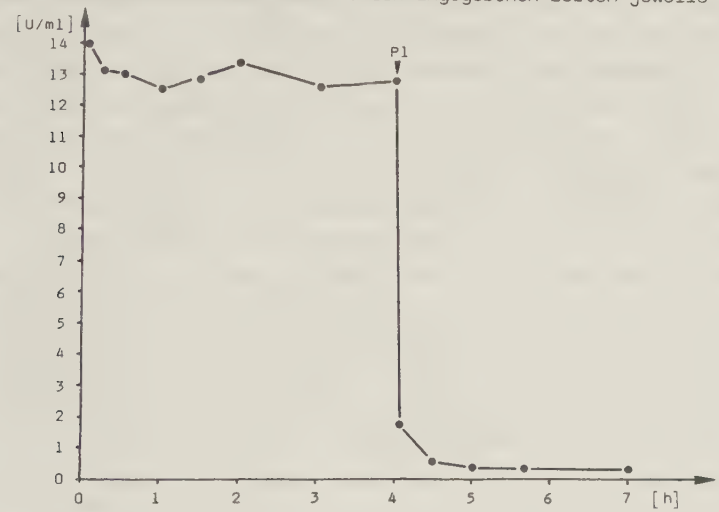


Abb. III.1: Inaktivierung der GAP-DH unter in situ - Bedingungen

Blut aus der Schwanzvene entnommen und sofort in 200 µl HEPES-Medium (mit 1 % Triton-x-100) lysiert. Um in allen Fällen (also auch nach der Enzym-Inaktivierung gut auswertbare Steigungen zu erhalten, wurden nach dem Zentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge) Probenvolumina von 20 µl bzw. 100 µl zur GAP-DH - Bestimmung eingesetzt. Auf eine Proteinbestimmung (zur Best. der spez. Aktivität) wurde hier verzichtet, da die Proteinkonzentrationen -aufgrund des hohen Anteils an Serumproteinen- ohnehin kein verläßliches Bezugssystem darstellt. Andererseits hatte sich in früheren Versuchen gezeigt, daß in dem hier diskutierten Zeitraum noch keine Hämolyse einsetzt. Aus diesen Gründen wurde die Enzymaktivität auf einen ml Blut bezogen (Volumenaktivität). Die ersten acht Messungen erfolgten am unbehandelten Tier, damit die Schwankungsbreite der Messungen in diesem Versuchsansatz ermittelt werden konnte. Auf diese Weise wurde ein Normalwert von 137 U/ml mit einer Standartabweichung von ± 8,6 U/ml ermittelt. Vier Stunden nach Versuchsbeginn wurde dann Pentalenolacton appliziert und 10 min. später erneut mit den Messungen fortgefahren. Es zeigte sich dabei, daß bereits 10 min. nach Pl-Gabe nur

noch 15 % der Ausgangsaktivität vorhanden war. Zwischen 10 min. und 30 min. nach Applikation des Pentalenolactons wurde dann die maximale Hemmung auf etwa 6 % Restaktivität (3 % - 8 %) erreicht. Es wurde bei diesem Versuch aufgrund des geringen Probenvolumens (5 µl) darauf verzichtet, die Erythrocyten zu waschen. Diese Handhabung ist aber dadurch gerechtfertigt, daß in vorangegangenen in situ - Experimenten bereits 10 min. nach Pl-Gabe kein freies aktives Pentalenolacton im Blut mehr nachgewiesen werden konnte (Kap. II).

Zusätzlich zu den in situ - Experimenten wurden auch Versuche mit isolierten Erythrocyten durchgeführt, vornehmlich um Aussagen über den glykolytischen Umsatz der Zellen zu erhalten, was in situ nicht ohne weiteres möglich ist. Das Endprodukt der Glykolyse ist bei Erythrocyten Lactat, das aus den Zellen freigesetzt wird. Der hier wiedergegebene Versuch mit isolierten Erythrocyten wurde in RPMI-1640-Medium durchgeführt, dem zusätzlich Humanserum (10 %), HEPES (20 %) und Gentamycin-Lösung (1 %) zugesetzt wurde. Das Medium entsprach somit dem Kultivierungsmedium für Human-Erythrocyten mit Plasmodium falciparum Infektion (vergl. dort) und ist somit für Erythrocyten-Kulturen gut etabliert. Ein zellschädigender Einfluß von Human-Serum auf die Mäuse-Erythrocyten -der bei der Verwendung von artfremdem Serum in Kulturen auftreten kann- war bei einer Versuchsdauer von nur 3 h nicht zu erwarten. Nach Zentrifugation des Blutes (5 min. bei 800 x g)wurden die Zellen zweimal in RPMI-Medium gewaschen und dann in einer Zelldichte von 2,5 x 10^9 Erythrocyten/ml aufgenommen. Die Suspensionen wurden bei 37°C und 65 rpm 15 min. vorinkubiert, dann wurden Proben für den Nullwert entnommen und zu einigen Ansätzen Pentalenolacton zugesetzt; die weiteren Probennahmen erfolgten zu den angegebenen Zeiten. Zur Zellzahlbestimmung wurden jeweils 5 µl Suspension 1 : 200 mit Sucrose-Citrat - Lösung verdünnt und sofort in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Für die Lactat-Bestimmung wurden je 100 µl Suspension mit 20 µl eiskalter TCA-Lösung (70 %) enteiweißt und nach dem Zentrifugieren direkt in den Lactat-Test eingesetzt. Die Proben für die GAP-DH - Bestimmung (ebenfalls je 100 µl) wurden sofort zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge), einmal mit Medium gewaschen und dann in Medium mit 1 % Triton-x-100 lysiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden verschiedene Probenvolumina (20 µl bis 100 µl) in den Enzym-Test eingesetzt.Wie aus Tabelle III.1 zu erkennen ist, findet

Zeit	Kontrolle	5 µg Pl/ml	50 µg Pl/ml
0 min.	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$
30 min.	$2,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
60 min.	$2,0 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
120 min.	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
180 min.	$2,6 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$

Tab. III.1: Bestimmung der Erythrocyten-Dichte zu verschiedenen Zeiten nach Pl-Zugabe

in dem hier betrachteten Zeitraum von 3 h keine Lyse der Erythrocyten durch Pl-Behandlung statt. Nach Abschluß des Versuchs wurden die Zellen nach 4,5 Stunden unter identischen Bedingungen weiterinkubiert, doch selbst nach dieser insgesamt 7,5 h währenden Inkubation war im Vergleich zu den Kontrollen noch keine signifikante Abnahme der Zelldichte durch Pentalenolacton festzustellen. Bei der GAP-DH - Bestimmung (Abb. III.2a) findet man in Suspensionen prinzipiell das gleiche Bild wie unter in situ - Bedingungen, d.h., eine sehr rasche Inaktivierung des Enzyms. Im vorliegenden Fall wurde aus technischen Gründen der erste Wert zwar erst 30 min. nach Pl-Zugabe bestimmt, in anderen Versuchsansätzen sah man aber bereits nach 10 min. die maximale Hemmung der Enzymaktivität.
Die Lactat-Bestimmung (Abb. III.2b) zeigt, daß praktisch vom Zeitpunkt der Pl-Zugabe an eine drastische Hemmung der Lactat-Bildung einsetzt. Ob der im Verlauf des Versuchs bei den Pl-behandelten Proben stattfindende ganz leichte Anstieg der Lactat-Konzentration auf minimale GAP-DH - Restaktivität -die mit dem verwendeten Testsystem nicht zu erfassen ist-, oder auf Umsetzung von 2,3-BPG zurückzuführen ist, kann nicht entschieden werden. In einer ganzen Reihe entsprechender Versuche in HEPES-Medium war mit vergleichbaren Pl-Konzentrationen stets ebenfalls ein leichter Anstieg registriert worden.
Man erkennt aus den dargestellten Ergebnissen, daß die zuvor aufgestellten Forderungen der Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Erythrocyten durch die Experimente vollständig bestätigt wurden.

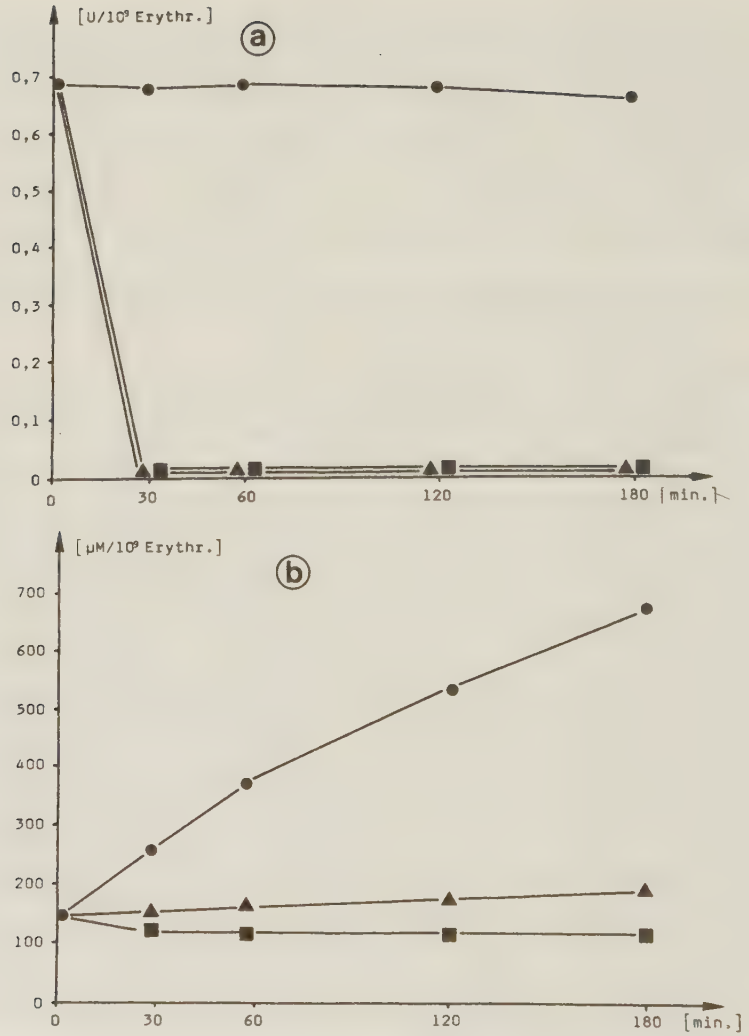


Abb. III.2: Wirkung von Pentalenolacton auf den Erythrocyten-Stoffwechsel. Es wurden resuspendierte Erythrocyten in RPMI-Medium verwendet. (●)= Kontrolle ohne Pl, (▲)= 5 µg Pl/ml, (■)= 50 µg Pl/ml.
a): GAP-DH - Bestimmung
b): Lactat-Bestimmung

2. Wirkung von Pentalenoalcton auf Hepatocyten

Da Erythrocyten durch Pentalenolacton-Behandlung ohnehin zugrunde gehen, ist dieses Zellsystem natürlich nicht geeignet, um Aussagen über die Wirkspezifität des Antibioticums zu erhalten. Man erkennt folglich nicht, ob neben der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase auch noch weitere Enzyme oder Zellfunktionen geschädigt werden. Darum wurden in weiteren Versuchen auch Hepatocyten verwendet, die zur Deckung ihres Energiebedarfs in ausgeprägtem Maße die Atmungskette betreiben. Hier sollte es also möglich sein, die Zellen trotz Pl-Behandlung lebensaktiv zu erhalten, sofern ihnen Substrate zur Verfügung stehen, die sie auf oxidativem Wege zu CO_2 abbauen können, wie z.B. Aminosäuren oder Pyruvat. Daß die Hepatocyten zusätzlich auch Glucose benötigen, etwa zur Aufrechterhaltung des Pentosephosphatcyclus´, liegt auf der Hand. Die aus theoretischen Gründen geforderte Fähigkeit der Leberzellen, trotz Ausfall der Glykolyse unter geeigneten Bedingungen überleben zu können, kann somit -sofern sie sich experimentell verifizieren läßt- als Kriterium für die Wirkspezifität von Pentalenolacton dienen.

Hierzu waren Versuche vorausgegangen, die zeigten, daß Pentalenolacton grundsätzlich auch auf Leberzellen angewendet werden kann. Diese Messungen waren an Hepatocyten-Suspensionen durchgeführt worden, wobei deutlich wurde, daß das Antibioticum rasch in die Zellen gelangt und dort -ebenso wie die Erythrocyten- eine schnelle Inaktivierung der GAP-DH und des glykolytischen Umsatzes erfolgt. Wie hier ebenfalls gezeigt werden konnte, hemmt Pl die GAP-DH - Funktion sowohl in glykolytischer, als auch in gluconeogenetischer Richtung. Bietet man also den Zellen in Gegenwart von Pl Lactat als Substrat an, so unterbleibt der Lactat-Umsatz und die Glucose-Bildung. Diese Untersuchungen habe ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt (2). Darüber hinaus zeigten aber auch die in situ - Versuche (Kap.II), daß Pentalenolacton eine rasche Inaktivierung der GAP-DH in Hepatocyten bewirkt.

Für Versuche, die im oben genannten Sinn Aussagen über die spezifische Wirkung von Pentalenolacton erlauben, sind aber Kurzzeit-Versuche, wie sie Messungen in Zellsuspensionen zwangsläufig darstellen, ungeeignet. Auch in situ - Experimente sind in dieser Hinsicht natürlich unbrauchbar, da undefinierbare Störungen durch den Gesamtorganismus auftreten. Darum wurden Primärkulturen von Ratten-Hepatocyten verwendet, die Eigen-

schaften besitzen, die sie für die hier geforderte Art von Versuchen besonders geeignet erscheinen lassen. Zum einen zeigen die Zellen in primären Kulturen -im Gegensatz zu Zellinien- bekanntlich noch die charakteristischen differenzierten Eigenschaften der Organe, aus denen sie hervorgegangen sind. Desweiteren reagieren Zellen relativ empfindlich auf äußere Störungen und man kann an der Morphologie des Monolayers die Qualität der Zellen verläßlich beurteilen. So sind nekrotische Degenerationen, aber auch ein schlechter Allgemeinzustand der Zellen im mikroskopischen Bild leicht zu erkennen. Zudem konnte in einer Reihe von Arbeiten (79 - 83, 90) gezeigt werden, daß verschiedene Enzyme in diesem Kultursystem -ebenso wie unter in situ - Bedingungen- einer aktiven Regulation unterliegen und ein gegebener Enzymspiegel (Basislevel) durch hormonelle Reize stimuliert werden kann. Diese Fähigkeit der Hepatocyten zur Enzyminduktion ist an die aktive Zellstruktur gebunden und kann als Ausdruck der Vitalität dieser Zellen gewertet werden.
Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden also zwei Versuchsaussagen angestrebt: erstens, ob Pentalenolacton auch in diesem Kultursystem zu einer Hemmung der GAP-DH führt, und zweitens, ob die Vitalität der Hepatocyten durch Pentalenolacton signifikant beeinträchtigt wird. Um den ersten Punkt abzuklären, wurde nur auf Messungen der GAP-DH - Aktivität zurückgegriffen, da Bestimmungen der Metabolit-Spiegel (GLucose bzw. Lactat) aufgrund der zu erwartenden Störungen durch den komplexen Intermediär-Stoffwechsel dieser Zellen nicht aussagekräftig wären. Um die Qualität der Hepatocyten zu bestimmen, wurde in erster Linie die visuelle Auswertung der Monolayer im Mikroskop herangezogen. Darüber hinaus wurde aber auch die Stimulierbarkeit der Tryptophan-Pyrrolase (ein Enzym des Tryptophan Abbaus) mit Dexamethason bzw. mit Dexamethason und Insulin herangezogen. Auf die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde hingegen verzichtet, da DNA zwar die Anwesenheit von Zellen dokumentiert, aber nichts über deren Qualität aussagt.
Im Folgenden ist nun ein repräsentatives Versuchsprotokoll wiedergegeben, das die Wirkung von Pentalenolacton auf primäre Hepatocyten-Kulturen beschreibt. Abb. III.3 zeigt die Versuchsdurchführung und gibt somit den genauen Verlauf und die Strategie des Experiments wieder. Man ersieht daraus die jeweiligen Zeitpunkte der Medienwechsel sowie der einzelnen Probennahmen und kann die dem normalen Medium beigefügten Zusätze (Hormone bzw. Pentalenolacton) leicht ablesen. Für den Versuch wurden 19

viersegmentige Petrischalen verwendet (1 - 19, vergl. auch Abb. III.3), wobei pro Segment 1,5 x 10^{-6} Zellen in je 1,5 ml W/AB 77 - Medium ohne Hormone und ohne Pl ausgesät wurden. Die Kulturschalen wurden unter den üblichen Inkubationsbedingungen (37°C; Luft mit 5% CO_2; wassergesättigte Atmosphäre) 5 Stunden zum Absetzen der Zellen stehen gelassen, dann erfolgte der erste Medienwechsel. Hierbei erhielten jeweils die drei Kulturschalen, die durch eine Linie miteinander verbunden sind, die angegebenen Zusätze zum normalen Medium: die Schalen 2, 8 und 14 also z. B.

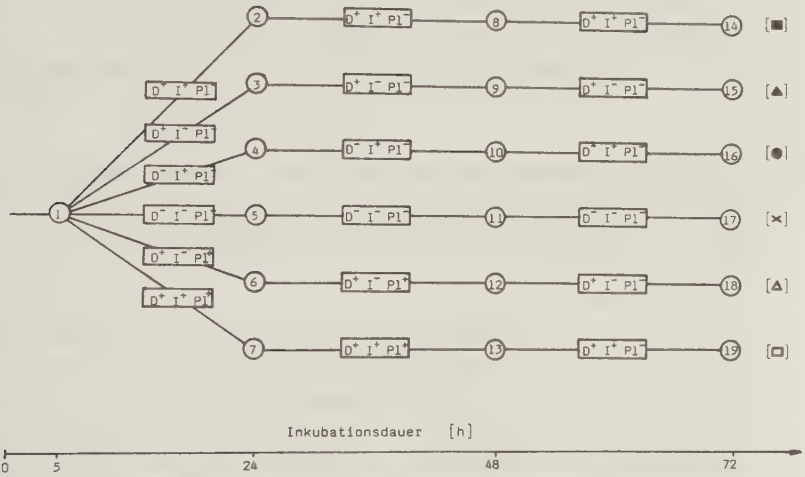


Abb. III.3: Versuch mit primären Hepatocyten-Kulturen. Durchführung des Experiments.

Dexamethason und Insulin, aber kein Pl. Die Schale 1 wurde für die Bestimmung zum Zeitpunkt 5 h aus dem Versuch herausgenommen. Nach 24 h erfolgte dann der nächste Medienwechsel, wobei die jeweils verbliebenen zwei Schalen jeder waagerechten Linie die zwischen 24 h und 48 h eingetragenen Zusätze erhielten etc. Die Hormone wurden dabei stets steril zu einer Endkonzentration von 1 x 10^{-6} M (Dexamethason) bzw. 0,17 x 10^{-6} M (Insulin) zum Medium supplementiert, Pentalenolacton (sterilfiltriert) wurde dem Medium in einer Endkonzentration von 12 x 10^{-6} M zugesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die im Diagramm senkrecht angeordneten Platten zur Auswertung verwendet. Dazu wurde das Medium dekantiert und der Zellrasen mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung sorgfältig

abgespült. Der Monlayer übersteht diese Prozedur normalerweise ohne Beschädigung, dagegen können tote Zellen, die sich aus dem Monolayer ablösen und diesem dann aufliegen, auf diese Weise entfernt werden. Pro Segment wurden 700 µl Kaliumphosphatpuffer (20 mM; pH 7.4) zugesetzt und die Zellen mit einem Gummischaber (" rubber policeman") von der Unterlage abgelöst. Die Suspensionen wurden jeweils 10 sec. beschallt (Sonifier B 12, Stufe 2.5 ≙ 35 Watt/sec.), dann wurde vom Zelldebries abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge) und die Überstände zur Enzymbestimmung und zur Messung der Proteinkonzentrationen verwendet. Für jeden Meßpunkt wurden somit Vierfachbestimmungen durchgeführt, und bei den Proteinbestimmungen wurden zusätzlich in jedem Segment drei Einzelmessungen vorgenommen, so daß jeder Meßpunkt durch 12 Meßwerte festgegelegt ist.

a) Bestimmung der GAP-DH - Aktivität: Abb. III.4 zeigt den Verlauf der spezifischen GAP-DH - Aktivitäten unter verschiedenen Bedingungen während der 72 stündigen Inkubationsdauer. In diesem Versuch wurde die GAP-DH - Bestimmung erst 19 h nach der ersten Pl-Zugabe gemessen, so daß streng genommen über den Verlauf der GAP-DH - Inaktivierung zwischen 5 h und 24 h hier keine Aussage gemacht werden kann. In anderen, an dieser Stelle nicht aufgeführten Versuchsansätzen zeigte sich jedoch, daß in den in vitro - Kulturen eine ebenso rasche Enzyminaktivierung eintrat wie in anderen Systemen; die hier wiedergegebene schnelle Hemmung der Enzymaktivität entspricht also dem tatsächlichen Verlauf. 19 Stunden später (Zeitpunkt:24 h) war dann noch immer keine GAP-DH - Aktivität in den Zellen nachweisbar. Wie aus Abb. III.3 zu ersehen ist, erhielten die mit Pentalenoalcton behandelten Kulturen die zweite und letzte Pl-Dosis zum Zeitpunkt 24 h. Auch hier ließ sich 24 h später (Zeitpunkt: 48 h) noch keine GAP-DH nachweisen. Erst 48 h später (Zeitpunkt:72 h) traten dann zwar geringe, aber doch eindeutig meßbare Enzymaktivitäten in Erscheinung. Der Verdacht liegt nahe, daß dieser Anstieg einer Neusynthese von GAP-DH entspricht, so daß im Zeitraum von 48 h mit dem normalen "turn over" des Enzyms zu rechnen wäre. An den übrigen Kurven der Abb. III.4 läßt sich ablesen, daß die GAP-DH weder durch Insulin (●), noch durch Dexamethason (▲), noch durch Insulin + Dexamethason (■) gegenüber der Kontrolle ohne Hormone (x) stimulierbar ist. Der relativ starke Abfall der spezifischen Enzymaktivitäten zwischen 24 h und 48 h

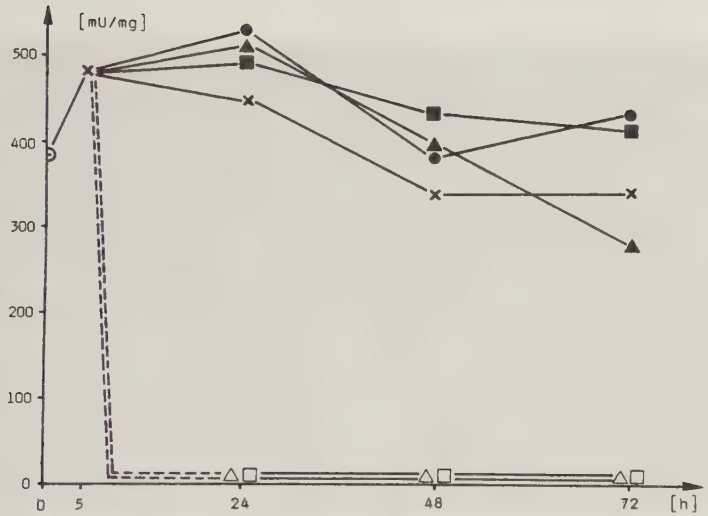


Abb. III.4: Spezifische Aktivitäten der GAP-DH unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen in prim. Hepatocyten-Kulturen

ist hier nicht so sehr auf eine drastische Aktivitätseinbuße zurückzuführen, sondern berücksichtigt die in diesem Zeitraum einsetzende Zunahme der Proteinkonzentration durch Ausbildung von Stützproteinen (z.B. Fibronectinen). Diese Zunahme der Proteinkonzentration findet sich übrigens in gleicher Weise auch in den mit Pl behandelten Kulturen. Der Grund für den ungewöhnlich starken Abfall der spez. Aktivität in der $D^+ I^- Pl^-$ - Kultur zwischen 48 h und 72 h ist nicht bekannt und durch die Proteinkonzentration nicht zu begründen:

$D^+ I^- Pl^-$ - Kultur nach 48 h: 2,96 ± 0,22 mg Prot./ml
$D^+ I^- Pl^-$ - Kultur nach 72 h: 2,66 ± 0,20 mg Prot./ml

b) Auswertung der mikroskopischen Kontrollen: Jeweils vor einem Medienwechsel und vor der Aufarbeitung einer Kultur wurde der Monolayer unter dem Mikroskop durchgemustert. In allen untersuchten Kulturen hatte sich nach etwa 24 h ein praktisch geschlossener Zellrasen ausgebildet, in dem die Zellen die in diesem System übliche Morphologie besaßen (Abb.III.5a, vergl. auch 83). Dieses charakteristische Aussehen änderte sich während der dreitägigen Kultivierungsdauer nur unwesentlich, insbesondere

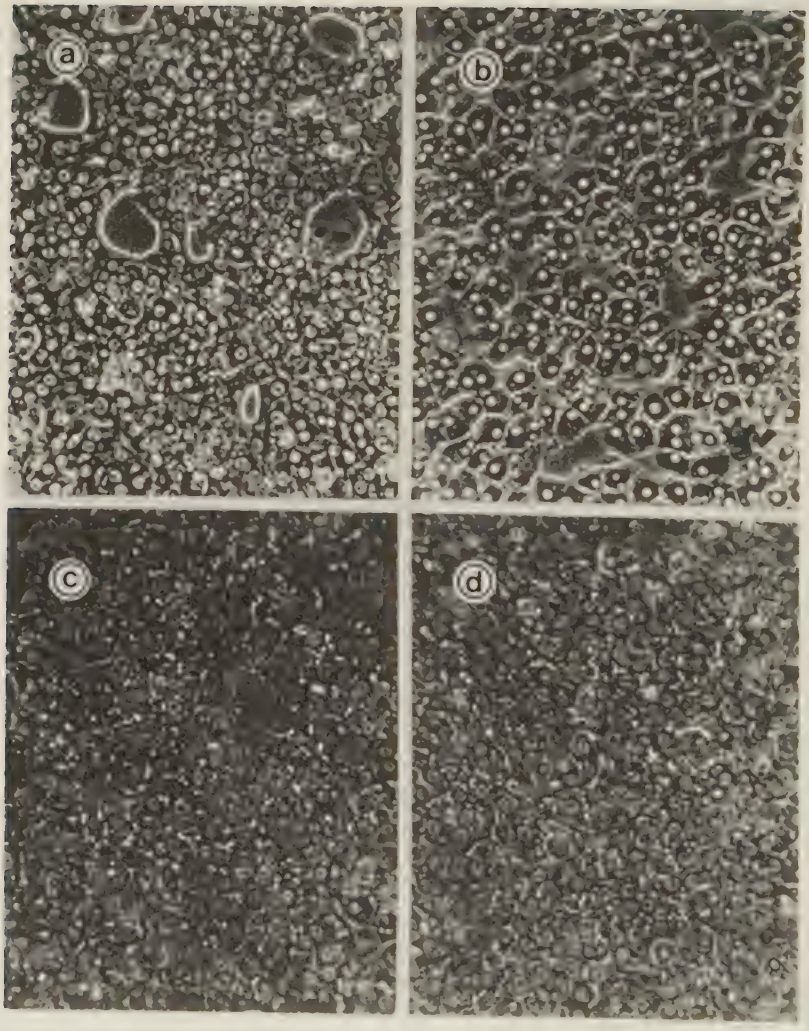


Abb. III.5: Hepatocyten-Monolayer, kultiviert mit Dexamethason und Insulin. Vergrößerung: 360fach (Phasenkontrast).
a) Kultivierungsdauer 24 h ohne Pl; b) wie a, mit Pl;
c) Kultivierungsdauer 48 h ohne Pl; d) wie c, mit Pl.

war aber zwischen Pl-behandelten und Pl-unbehandelten Kulturen zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied sichtbar (Abb. III.5a - d).

c) Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase - Aktivität: Die Tryptophan-Pyrrolase (Tryptophan-2,3-Dioxygenase) ist bei höheren Organismen ein leberspezifisches Enzym, das bezüglich seiner Regulation gut untersucht ist (84, 86 - 88, 92). Das dargestellte allgemeine Schema (Abb. III.6) zeigt die Regulation und die Wirkung der Tryptophan-Pyrrolase. Man erkennt bereits an der schematischen Übersicht, daß dieses Enzym vielfältigen Regulationsschritten unterliegt, wobei die Glucocorticoide, wie unter in situ - Bedingungen gezeigt werden konnte (84, 92), auf der Stufe der

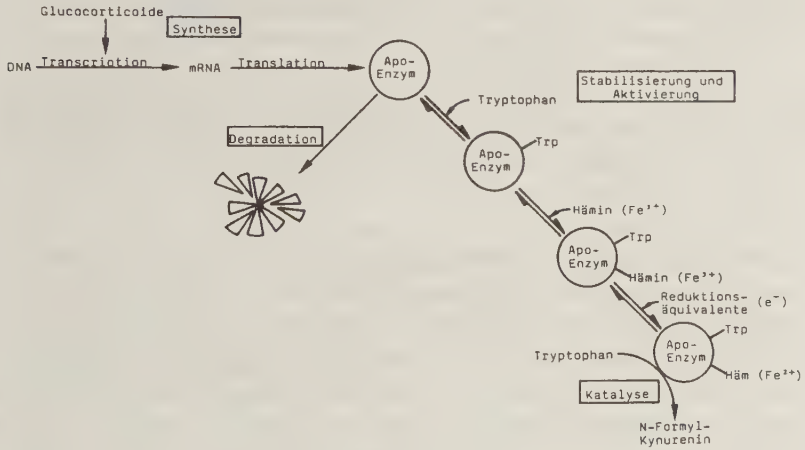


Abb. III.6: Regulation und Wirkung der Tryptophan-Pyrrolase (verändert nach 89).

Transcription einwirken und zu einer Neusynthese des inaktiven Apo-Enzyms führen. Kürzlich konnte nun T. Nakamura et al. (91) sowie unabhängig davon H. Metzler im Rahmen seiner Dissertation (89) nachweisen, daß auch in in vitro - Kulturen eine vergleichbare hormonelle Stimulierung der TP eintritt.
Abb. III.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der spezifischen Tryptophan-Pyrrolase - Aktivitäten unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Der Basallevel der Enzymaktivität ergibt sich dabei aus der

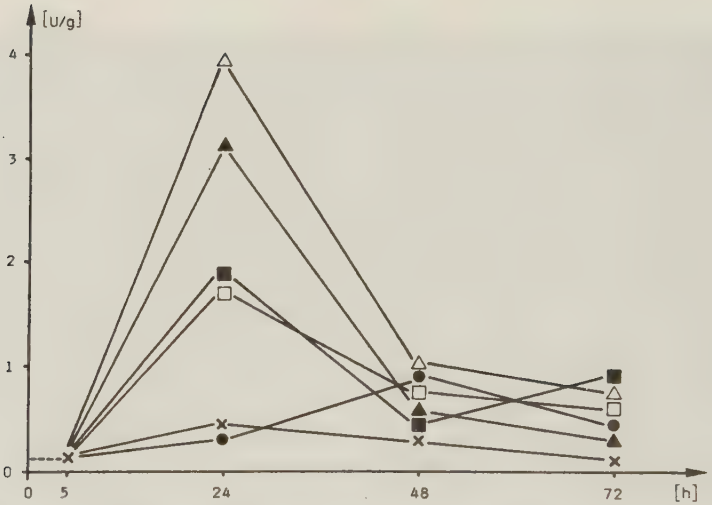


Abb. III.7: Spezifische Aktivitäten der Tryptophan-Pyrrolase unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen in prim. Hepatocyten-Kulturen.

Kurve ohne Hormone (×). Wie man sieht, führt der Zusatz von Dexamethason (▲) zu einem Anstieg der spezifischen Aktivität um den Faktor 5. Diese Enzyminduktion bleibt auch dann erhalten, wenn die Zellen zusätzlich mit Pl belastet werden (△), wobei hier sogar noch eine Erhöhung der TP-Aktivierung um etwa 35 % stattfindet. Dieses Ergebnis unterstützt also den visuellen Eindruck der mikroskopischen Untersuchungen, nach dem Pentalenolacton die Vitalität von Hepatocyten offenbar nicht beeinflußt, obwohl eine rasche und anhaltende Inaktivierung der GAP-DH auf nicht mehr meßbare Aktivitäten eintritt. Die Kurve mit Insulin (●) zeigt, daß dieses Hormon allein die TP nicht zu induzieren vermag; die gemessenen Aktivitäten entsprechen im Rahmen der Meßgenauigkeit dem Basallevel. Durch gleichzeitige Gabe von Insulin und Dexamethason ist zwar noch eine signifikante Steigerung der TP-Aktivität festzustellen, doch ist diese Stimulierung geringer als mit Dexamethason allein. Eine ausführliche Diskussion dieses Phänomens findet sich bei H. Metzler (89), an dieser Stelle sei nur angemerkt, daß Pentalenolacton auch in diesem Fall keine Änderung des spezifischen Verhaltens der Hepatocyten bewirkt.

3. Wirkung von Pentalenolacton auf Ehrlich Ascites Tumor Zellen

Im Gegensatz zu Erythrocyten und Hepatocyten ist die Wirkung, die ein spezifischer Glykolyse-Hemmer auf den Gesamtstoffwechsel von Ehrlich Ascites Tumor Zellen ausübt, nicht ohne weiteres vorhersagbar. Einerseits zeigen diese Zellen -wie auch andere carcinogen entartete Zellen- eine relativ hohe Glykolyse-Rate, die in diesem Fall durch den Crabtree-Effekt sogar noch unterstützt wird, andererseits sind die Enzyme der Atmungskette vollständig vorhanden und offensichtlich funktionell intakt (74), so daß die ATP-Bildung bei blockierter Glykolyse über die Atmungskette erfolgen könnte. Um nun die Wirkung von Pentalenolacton auf EAT-Zellen experimentell erfassen zu können, wurden die Zellen in drei verschiedenen Systemen getestet, nämlich in Zell-Suspensionen, in der in vitro - Kultur und unter in situ - Bedingungen.

a) Bestimmung der Pl-Wirkung auf EAT-Zellen: Nach der Isolierung wurden die Zellen zweimal in HEPES-Medium ohne Glucose gewaschen und anschließend in HEPES-Medium mit Glucose aufgenommen, wobei eine Zelldichte von 1×10^8 EATC/ml eingestellt wurde. Die Suspensionen wurden zu je 4 ml Portionen in 8 Erlenmeyer-Kölbchen (25 ml Nennvolumen) überführt und bei 37°C und 60 rpm inkubiert. Zu drei Ansätzen wurden verschiedene Pentalenolacton-Konzentrationen zugesetzt, während ein Ansatz als Kontrolle diente; es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 0 min.(Beginn der Inkubation bei 37°C und Zusatz von Pl), 10 min., 30 min., 60 min., 90 min. und 120 min. wurden aus allen Ansätzen Proben entnommen und nach der jeweiligen Vorbereitung zur Bestimmung der Metabolite bzw. der GAP-DH verwendet.

Inkub.-Ansatz Nr.	C-Quelle	Pl-Konz. µM	Hemmung d. GAP-DH in %	Anzahl d. Meßwerte
I / II	20 mM	0	keine	10
III / IV	Glucose	18	32 %	10
V / VI	in allen	54	85 %	10
VII / VIII	Ansätzen	90	100 %	10

Tab. III.2: Hemmung der GAP-DH durch verschiedene Pl-Konzentrationen in EATC-Suspensionen.

Die Zeitverlaufkurven zeigten dabei, daß die Metabolitkonzentration in der Kontrolle und bei 18 µM Pl zu allen Zeiten im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch waren, während die GAP-DH - Aktivität auf etwa 70 % der Ausgangsaktivität gesunken war (vergl. Tab. III.2). Bei einer Pl-Konzentration von 54 µM fand sich in den Zellen dann nur noch eine Restaktivität von 15 %, was zu einem signifikanten Anstau von FBP und DAP führte, während der ATP-Level um etwa 20 % sank; die Lactat-Produktion war überraschenderweise nur geringfügig eingeschränkt. Bei einer Pl-Konzentration von 90 µM war in den Zellen dann keine GAP-DH mehr nachweisbar und entsprechend blieb der Lactat-Level, der bis zum Zeitpunkt 10 min. noch wie in der Kontrolle angestiegen war, von da ab konstant. Auch hier dauerte es also etwa 10 min., bis Pentalenolacton wirksam wurde. FBP und DAP stauten sich bei dieser Pl-Konzentration stark an und der ATP-Level sank um etwa 60 %. Die Ergebnisse sind in Abb. III.8 zusammengefaßt. Hierbei wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung aller einzelnen Zeitverlaufskurven verzichtet, vielmehr sind die Ergebnisse wiedergegeben, die sich 60 min. nach Versuchsbeginn eingestellt hatten (vergl. auch 11).

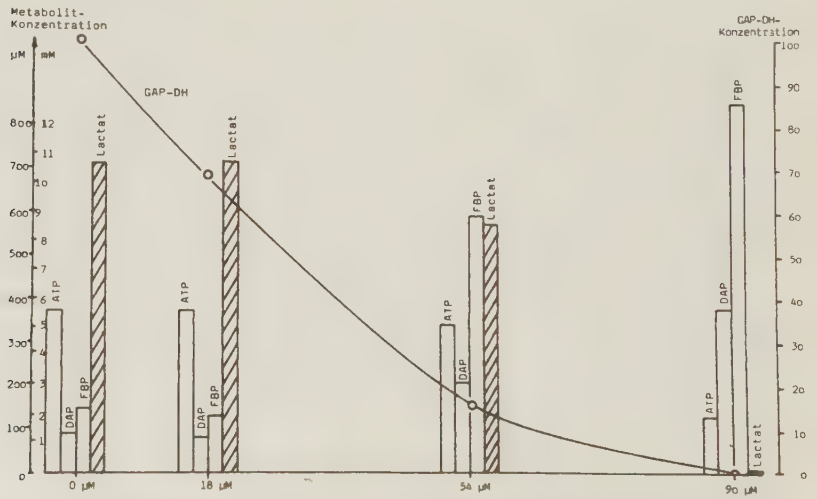


Abb. III.8: Änderung der Metabolit-Konzentrationen und der GAP-DH - Aktivität durch verschiedene Pl-Dosen in EATC-Suspensionen 60 min. nach Pl-Zugabe. Die Zelldichte betrug 1×10^8 EATC/ml. GAP-DH in % Restaktivität, Lactat in [mM]. ATP, Dihydroxyacetonphosphat (DAP) u. Fructose-1,6-Bisphosphat in [µM].

Im ganzen gesehen gibt das Diagramm das Gesamtergebnis des Versuchs sehr gut wieder. Es ist aber bemerkenswert, daß es 10 min. nach Versuchsbeginn zu einem starken Anstau von FBP auf etwa 800 µM in allen Suspensionen kam. In der Kontrolle ohne Pl sowie bei der kleinsten Pl-Konzentration (18 µM) fiel die FBP-Konzentration dann jedoch schnell wieder ab und blieb ab 30 min. bis zum Schluß des Versuchs konstant bei etwa 100 µM. In der höchsten Pl-Konzentration (90 µM) blieb der FBP-Level jedoch konstant auf diesem hohen Niveau von etwa 800 µM, während sich bei einer Pl-Konzentration von 54 µM ein ungefährer Mittelwert einstellte. Es kommt hier also offenbar zu einem kurzfristigen Metabolit-Anstau, bis ein optimaler Glykolyse-Durchsatz erreicht wird und sich ein "steady state" auf niedrigem Niveau einstellt. Beim Dihydroxyacetonphosphat zeigte sich übrigens der gleiche Effekt, nur war er hier weniger stark ausgeprägt.

Wie man sieht (Abb. III.8), fällt der ATP-Spiegel in EATC-Suspensionen drastisch ab, wenn man die Zellen mit Pl behandelt und Glucose die einzige C-Quelle darstellt. Es wurden darum Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, ob dieser Abfall durch die Anwesenheit von Substraten verhindert werden kann, die -ohne über die Glykolyse umgewandelt werden zu müssen- in den Citrat-Cyclus einmünden können. Es wurde dazu Lactat, Succinat und Acetat verwendet, wobei für die beiden letztgenannten Substrate beschrieben wurde, daß sie den Crabtree-Effekt senken sollen (51, 68). Wie die Abb. III.9 zeigt, war es jedoch weder mit Lactat noch mit Succinat möglich, die durch Pl verursachte Erniedrigung des ATP-Levels aufzuheben. Dieser Versuch wurde in der Weise durchgeführt, daß die Zellen in Glucose-haltigem HEPES-Medium in Gegenwart von 90 µM Pl (△) bzw. ohne Pl (▲) inkubiert wurden. Zum Zeitpunkt 60 min. wurde dann Lactat- bzw. Succinat-Stammlösung (pH 7.4) zu einer Endkonzentration von 20 mM supplementiert. Wie man sieht, kam es hier nicht zu einem signifikanten Anstieg der ATP-Konzentration. Der Abfall des ATP-Spiegels durch Pl konnte auch dann nicht verhindert werden, wenn Succinat bereits zum Zeitpunkt der Pl-Zugabe im Testansatz neben Glucose enthalten war. Wurden umgekehrt die Zellen zunächst in glucosefreiem, lactat- oder succinathaltigem Medium vorinkubiert, so kam es sowohl mit Pl als auch ohne Pl zu einem deutlichen Abfall der ATP-Kozentration innerhalb der ersten 40 min. Glucose-Zusatz (Endkonzentration : 20 mM) führte dann jedoch

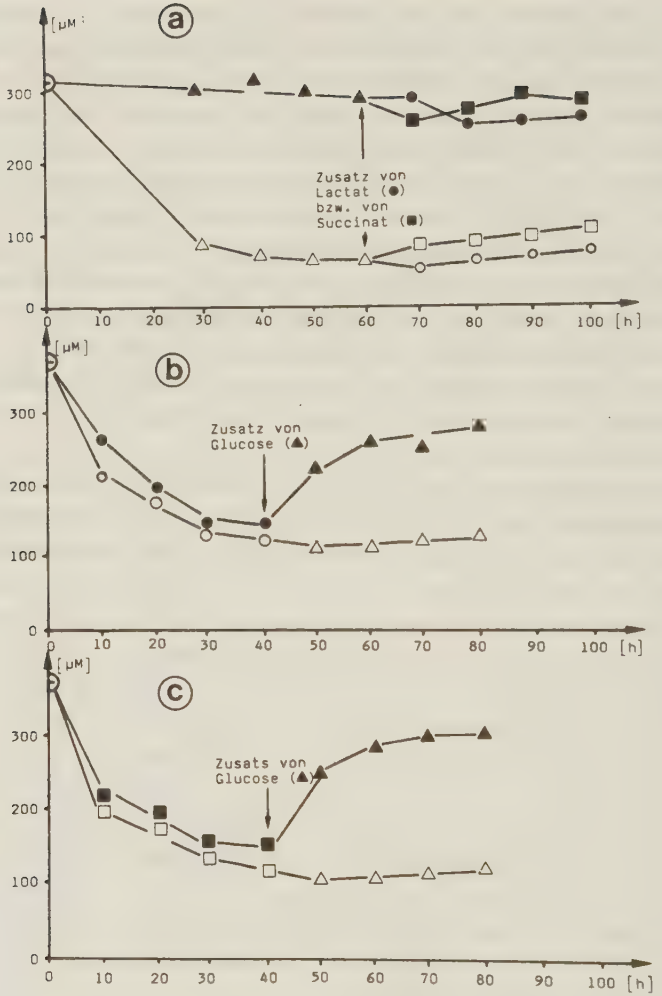


Abb. III.9: Bestimmung der ATP-Konzentration in Ehrlich Ascites Tumor Zellen bei Verwendung verschiedener Substrate. Ansätze ohne Pi sind durch geschlossene, solche mit Pi durch offene Symbole dargestellt. (▲) = Glucose, (●) = Lactat, (■) = Succinat.
a) Inkubation mit Glucose und Zusatz von Lactat bzw. Succinat nach 60 min., b) Inkubation mit Lactat und Zusatz von Glucose nach 40 min., c) Inkubation mit Succinat und Zusatz von Glucose nach 40 min.

sowohl in Lactat-, als auch in Succinat-Medium zu einer raschen und deutlichen Erhöhung der ATP-Konzentration. In den Pl-haltigen Medien war diese Steigerung natürlich nicht möglich (Abb. III.9b und c). Ähnliche Versuche mit Acetat zeigten das gleiche Ergebnis. Wie diese Versuche belegen, sind die hier eingesetzten Substrate (Lactat, Succinat und Acetat) in Bezug auf die Energieausbeute der Glucose nicht gleichwertig und können den Pl-Effekt auf die ATP-Konzentration zumindest nicht kompensieren.

b) Bestimmung der Pl-Wirkung auf in vitro - Kulturen von EATC: Wie die Untersuchungen an EAT-Zellsuspensionen gezeigt haben, tritt die Pl-Wirkung etwa 10 min. nach Zugabe des Antibioticums in Erscheinung und bleibt dann während der nächsten Stunden erhalten. Die Hemmung der GAP-DH wird dabei begleitet von einem Anstau der Metabolite oberhalb des GAP-DH - Schrittes, nämlich Fructose-1,6-Bisphosphat und Dihydroxyacetonphosphat unter gleichzeitiger Verhinderung der Lactat-Bildung; der ATP-Level der Zellen sinkt um etwa 60 %. Darüber hinaus ließ sich zeigen, daß nicht glykolysepflichtige Substrate (Lactat, Succinat, Acetat) den durch Ausfall der Glykolyse bedingten ATP-Verlust nicht kompensieren können. Die Frage, ob EAT-Zellen unter diesen Bedingungen überleben können, ließ sich in diesem System allerdings nicht klären. Deshalb wurden in vitro - Kulturen angelegt, wobei diese Kulturen jeweils mit einer Zelldichte von 1 x 10^5 EATC/ml gestartet wurden. Aufgrund der komplexen Medienzusammensetzung (vergl. Anhang) sind dabei genügend oxidierbare Substrate zugegen, so daß die Zellen auf Atmung "umschalten" sollten, sofern sie diesen Weg bei blockierter Glykolyse alternativ zur Energieversorgung nutzen können. Wie die Abb. III.10 zeigt, ist dies aber nicht der Fall. Wenn Pentalenolacton (Konzentration in diesem Ansatz 18 µM) zugegen war, kam es im Verlauf der Kultivierung zu einer stetigen Abnahme der intakten, mit Trypanblau nicht anfärbbaren Zellen. Dabei war es prinzipiell gleichgültig, ob Pl bereits zu Beginn der Kultivierung (△) oder erst etwa 6 h später zugesetzt wurde (□), so daß sich die Zellen erst an die Kulturbedingungen adaptieren konnten. Nach 36 h Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml aufgenommen und durch Beschallen aufgeschlossen. Hierbei zeigte sich, daß in der Kontrolle eine GAP-DH - Aktivität von 3,9 U/10^7 EAT-Zellen auftrat,

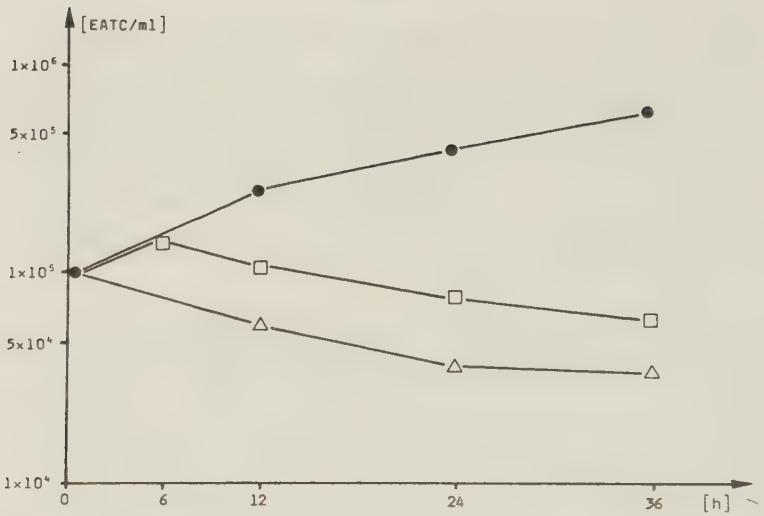


Abb. III.10: Wachstumskurven von Ehrlich Ascites Tumor Zellen in in vitro - Kulturen. (●)= Kontrolle ohne Pl; (△)= Zusatz von 18 µM Pl beim Start der Kultur; (□)= Zusatz von 18 µM Pl 6 h nach Beginn der Kultivierung.

während in den Pl behandelten Kulturen keine GAP-DH mehr nachweisbar war. Da in der Literatur (70) auch Glutamin als gut verwertbares Substrat im Energiestoffwechsel von Tumor-Zellen beschrieben worden ist, wurde in einigen Ansätzen die Glutamin-Konzentration im Medium auf 10 mM erhöht. Doch auch unter diesen Bedingungen erhielt man die gleichen Ergebnisse wie oben. Aufgrund der hier dargestellten Experimente ergibt sich also die Schlußfolgerung, daß Ehrlich Ascites Tumor Zellen offenkundig nicht in der Lage sind, einen Block in der Glykolyse durch eine erhöhte Atmung zu kompensieren.

c) Bestimmung der Pl-Wirkung unter in situ - Bedingungen: Unter dem Eindruck der obigen Ergebnisse wurde auch versucht, eine Wachstumshemmung der EAT-Zellen unter in situ - Bedingungen zu erreichen. Diese Versuche schlugen jedoch durchweg fehl, d.h., mit Pl-Dosen bis zur Toxizitätsgrenze von 100 µg Pl/Maus -i.p. appliziert- ließ sich die Ausbildung des Ascites Tumors weder verhindern, noch signifikant verlangsamen. Dieses Ergebnis ist aber wohl nicht auf ein anderes Stoffwechsel-

verhalten der EAT-Zellen unter diesen Bedingungen zurückzuführen, sondern ergibt sich aus der raschen Aufnahme des Pentalenolactons in die Blutbahn und die Gewebe sowie der schnellen metabolischen Inaktivierung. Diese Hypothese wird vornehmlich dadurch gestützt, daß durch eine 15 min. Vorinkubierung eines Inokulums mit Pentalenolacton (90 µM) die Ausbildung eines Tumors verhindert werden konnte. D.h., wenn Ascites-Suspension aus einer infizierten Maus entnommen und 15 min. bei Raumtemperatur mit Pl inkubiert wird, so werden die EAT-Zellen letal geschädigt und gehen nach Übertragung auf ein gesundes Tier zugrunde.

4. Wirkung von Pentalenolacton auf Plasmodium vinckei und Plasmodium falciparum

Plasmodien, die Erreger der Malaria, sind intrazelluläre Parasiten, die im Wirbeltier vornehmlich in den Erythrocyten leben. In diesen Wirtszellen durchlaufen sie eine Entwicklungskaskade, die mit der Infektion des Erythrocyten durch -in der Regel- einen Merozoiten beginnt und mit der Zerstörung der Wirtszelle und gleichzeitiger Freisetzung einer Vielzahl von Parasiten endet. Die dabei stattfindende Zellvermehrung beruht jedoch nicht auf einer fortgesetzten Zellteilung, sondern erfolgt in mehreren Einzelschritten. Der in den Erythrocyten eingedrungene Merozoit nimmt zunächst eine charakteristische ringförmige Struktur an (Ringstadium) und wandelt sich dann in eine vielkernige Einzelzelle (Trophozoit) um. Hieraus entsteht in der Folge ein vielzelliger Schizont, der schließlich in einzellige Merozoiten zerfällt; der Erythrocyt geht dabei zugrunde. Merozoiten sind darauf angewiesen, möglichst rasch einen gesunden Erythrocyten zu infizieren, da sie frei im Blut nur sehr begrenzte zeit überlebensfähig sind. Dieser komplizierte Entwicklungsverlauf macht Untersuchungen zum spezifischen Stoffwechsel der Plasmodien außerordentlich schwierig, da es in der Regel nicht möglich ist, den Parasitenstoffwechsel von dem der Erythrocyten getrennt zu messen. Die vielfach praktizierte Methode der Differenzbildung: Stoffwechselleistung infizierter Erythrocyten minus Stoffwechselleistung gesunder Erythrocyten ist jedoch durchaus fragwürdig, da so eine mögliche Beeinflussung der Erythrocyten durch die Parasiten nicht erfaßt werden kann. Andererseits können isolierte Plasmodien in diesem für sie unphysiologischen Zustand einen atypischen Metabolismus zeigen, da es experimentell nicht möglich ist, das intraerythrocytäre Milieu zu simulieren. Darüber hinaus ist es noch weitgehend ungeklärt, ob und in wieweit sich die einzelnen Stadien der Blutschizogonie in Bezug auf ihre Stoffwechselaktivitäten voneinander unterscheiden. Doch trotz dieses Dilemmas gilt es als sicher, daß Plasmodien zumindest den weit überwiegenden Teil ihres Energiebedarfs durch anaerobe Glykolyse decken (97), denn sowohl in infizierten Erythrocyten, als auch in isolierten Plasmodien findet man eine sehr hohe Glucose-Umsatzrate und Lactat-Bildung.
Bereits in meiner Diplomarbeit habe ich dazu entsprechende Versuche

durchgeführt. Hier ließ sich zeigen, daß infizierte Erythrocyten mit einer Infektionsrate von etwa 30 % in gleichen Zeiträumen rund dreimal mehr Lactat produzieren als gesunde Erythrocyten. Mit einer Pentalenolacton-Konzentration von 5 µg/ml war die Lactat-Bildung jedoch vollständig hemmbar (10). Hingegen scheint die Atmung in Bezug auf ATP-Bildung nur von untergeordneter Bedeutung zu sein (94, 96). Allerdings ist eine gewisse Skepsis bei der Beurteilung dieser Ergebnisse durchaus angebracht. So wurden zwar alle Glykolyse-Enzyme in Plasmodien nachgewiesen, bislang ist es aber noch nie gelungen, all diese Enzyme gleichzeitig in einer Spezies aufzufinden (98). Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde im vorliegenden Fall nicht versucht, die Wirkung von Pentalenolacton auf den separaten Plasmodien-Stoffwechsel zu bestimmen, vielmehr sollte gezeigt werden, ob Plasmodien eine Pl-Behandlung in ihrer natürlichen Umgebung überleben können und unter diesen Bedingungen infektiös bleiben. Für diese Versuche wurde zunächst Plasmodium vinckei verwendet, Erreger einer experimentellen Nagetier-Malaria, das bei Mäusen einen fulminaten Parasitaemieverlauf zeigt. Die Infektion führt in der Regel in etwa 5 Tagen zum Tod der Tiere. In einem infizierten Tier ließ sich dieser Krankheitsverlauf durch Gabe von Pentalenolacton (bis 100 µg/Tier, intraperitoneal appliziert) weder verhindern noch signifikant mildern. Allerdings wurde die Parasitaemie auch hier stets verhindert, wenn das Inokulum (infiziertes Blut eines Spendertieres) vor der Applikation 15 min. mit Pentalenolacton inkubiert wurde. Die hierzu verwendete Pl-Konzentration betrug 360 µM (100 µg/ml). Das ist im Vergleich zu den in Suspensionen verwendeten Pl-Dosen relativ hoch, doch ist hier mit unspezifischen Adsorptionen von Pl an Serumproteine und Blutzellen zu rechnen, so daß diese Dosis gerechtfertigt erschien, die Wirksamkeit geringer Konzentrationen wurde allerdings nicht getestet. Bei diesen Versuchen wurde das in der Regel hoch infizierte Blut einer Malaria-Maus 1 : 1 mit Sucrose-Citrat (SC) verdünnt und in zwei Portionen gesplittet. Ein Ansatz erhielt eine entsprechende Menge Pl, dann wurden beide Ansätze 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 0,2 ml Dosen auf gesunde Labortiere übertragen. Während unbehandeltes SC-Blut ausnahmslos zur Infektion führte, wurde durch Pl- behandeltes SC-Blut niemals eine Parasitaemie ausgelöst. Das gleiche Ergebnis erhielt man, wenn statt SC-Blut heparinisiertes Voll-

blut verwendet wurde, so daß die Verdünnung mit Sucrose-Citrat keinen Einfluß hat. Die Pl-Menge, die auf diese Weise in die Mäuse eingeschleppt wurde, betrug maximal 20 µg Pl/Tier und lag somit weit unter der Letaldosis.

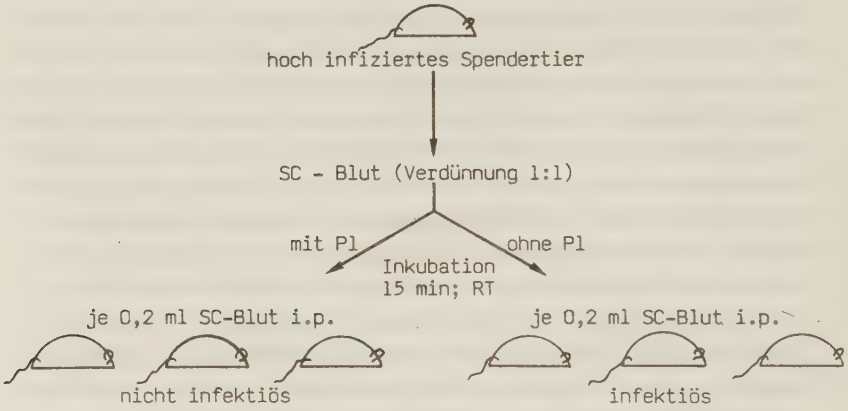


Abb. III.11: Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Infektiosität von infiziertem SC-Blut nach Pl-Behandlung.

Da die Blutschizogonie in Mäusen nicht synchron verläuft, sind in infiziertem Blut alle Stadien auffindbar, also auch reife Merozoiten. Dennoch ist das Argument schwer zu entkräften, daß durch die zweifellos auch auftretende Schädigung der infizierten Erythrocyten die Reifung der verschiedenen intraerythrocytären Stadien verhindert würde und der Anteil an Merozoiten zu gering ist, um die Parasitaemie manifest werden zu lassen, mithin die Schädigung der Plasmodien nur durch die Zerstörung der Wirtszellen begründet ist. Darum wurde heparinisiertes Vollblut von zwei hoch infizierten Mäusen entnommen und bei geringer Tourenzahl zentrifugiert (5 min.; 100 x g). Der Überstand, der nach dieser Prozedur vollständig erythrocytenfrei, aber mit Merozoiten angereichert war (was sich in der mikroskopischen Kontrolle zeigte), wurde nun ebenfalls halbiert. Eine Hälfte erhielt wie oben angegeben Pl, dann wurden beide Ansätze 10 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Aus jeder Charge

wurden je 500 µl intravenös auf gesunde Mäuse überimpft, wobei ebenfalls nur durch das Pl unbehandelte Inokulum eine Parasitaemie ausgelöst wurde; die Pl behandelte Probe war stets nicht infektiös.

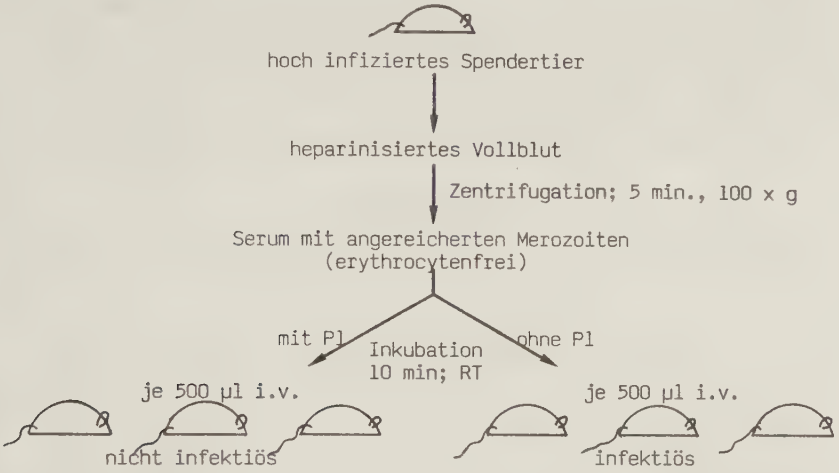


Abb. III.12: Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Infektiosität von isolierten Merozoiten nach Pl-Behandlung.

Im Anschluß an diese Untersuchungen sollte nun gezeigt werden, ob Pentalenolacton auch humanpathogene Plasmodien letal schädigt: es wurde dazu Pl. falciparum, der Erreger der Malaria tropica, verwendet. Da für diese Spezies außer seltenen Primaten (Schimpansen bzw. der in Südamerika lebende Nachtaffe (Aotes trivirgatus)) keine Labortiere als Wirte bekannt sind, wurde auf in vitro - Kulturen zurückgegriffen (100). Diese Versuche wurden in Zusammenhang mit Prof. Spira vom Institut of Life Science an der Hebrew University in Jerusalem durchgeführt, der dieses Kultivierungssystem während eines Forschungsaufenthaltes in Tübingen etabliert hat.

Für die Versuche wurde eine hoch infizierte Kultur mit einer Parasitaemie von 10 % (d.h., 10 % aller Erythrocyten sind parasitiert) entnommen und zentrifugiert (5 min., 100 x g). Die Zellen wurden mit Kultivierungsmedium (RPMI 1640, ohne Serum) gewaschen und im gleichen Medium auf einen Hämatokrit von 50 % eingestellt. Dieser Ansatz wurde gesplit-

tet und beide Suspensionen dann 10 min. bei 37°C inkubiert, wobei eine Hälfte 20 µl Pl-Stammlösung (s.o.) zugesetzt worden war. Nach dieser Inkubation wurden beide Ansätze je zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, um überschüssiges Pl zu entfernen. Während dieser Zeit waren vier neue Kulturen mit einem Hämatokrit von 5 % vorbereitet worden, die nun mit den parasitierten Erythrocyten infiziert wurden. Die mikroskopische Kontrolle zeigte dabei eine Parasitaemie der neu infizierten Kulturen von 2 %. Das Medium der Kulturen wurde täglich gewechselt, wobei stets auch

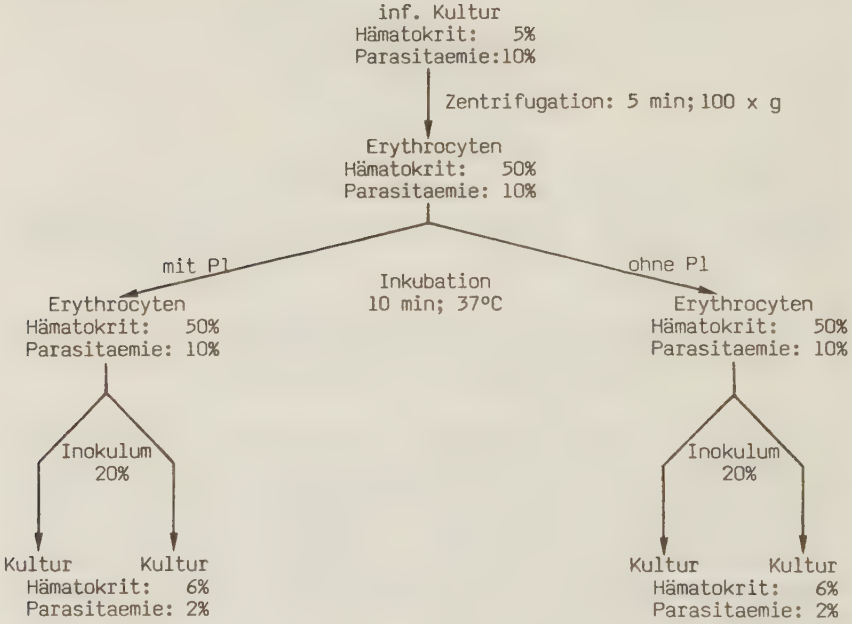


Abb. III.13: Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Infektiosität von Plasmodium falciparum in in vitro - Kulturen nach Pl-Behandlung.

die Parasitaemie kontrolliert wurde. Dabei zeigte sich in den Kontrollen ein üblicher Parasitaemie-Verlauf, der in 4 Tagen zu einer in diesem System maximal erreichbaren Parasitaemie von 10 % führte. Die Kultur ging zu diesem Zeitpunkt aufgrund der hohen Hämolyse zugrunde. In den

Pl-behandelten Proben waren jedoch während der gesamten Kultivierungsdauer keine infizierten Erythrocyten zu sehen (Tab. III.3).

Versuchstag	Inokulum ohne Pl		Inokulum mit Pl	
1.	2 %	2 %	2 %	2 %
2.	3-5 %	3-5 %	0	0
3.	6 %	6 %	0	0
4.	9 %	9 %	0	0
5.	starke Lyse		0	0

Tab. III.3: Parasitaemie-Verlauf in in vitro - Kulturen von Plasmodium falciparum mit und ohne Pentalenolacton.

Es wurde nun versucht, als Inokulum nur Merozoiten und solche Erythrocyten zu verwenden, die reife Schizonten beherbergen, und andere Stadien, vor allem aber nicht infizierte Erythrocyten abzutrennen. Dazu wurden die Zellen einer hoch parasitierten Kultur nach dem Zentrifugieren in 5 ml Gelatine-Lösung (0,5 %ig in RPMI-Medium) aufgenommen und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Unter diesen Bedingungen aggregieren gesunde Erythrocyten und solche, die frühe Parasitenstadien enthalten und sinken nach unten. Da hoch infizierte Erythrocyten aufgrund veränderter Oberflächenstrukturen nicht mehr aggregieren können, flotieren sie ebenso wie Merozoiten und reichern sich im Überstand an. Dies ist eine gängige Methode zur Synchronisierung einer Kultur. Nach etwa 30 min. wurden vom Überstand 2 x 25 µl abgehebert und auf je 1 ml RPMI-Medium aufgefüllt. Zu einem Ansatz wurde wiederum 20 µl Pl-Stammlösung zugesetzt, dann erfolgte wie üblich eine 10 min. Inkubation beider Suspensionen bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, je 1 mal in RPMI-Medium gewaschen, zuletzt nochmals gesplittet und je zwei frischen Kulturen zugesetzt (vergl. Schema des Versuchsansatzes). Wie die Tabelle III.4 zeigt, können die Plasmodien sich auch in diesem System nicht weiter vermehren und gehen zugrunde.
Die hier angeführten Versuche belegen, daß die verwendeten Plasmodien (Pl. vinckei und Pl. falciparum) in ihrem Energiestoffwechsel notwendig auf eine funktionierende Glykolyse angewiesen sind und deren Blockierung durch Hemmung der GAP-DH nicht kompensieren können. Die rasche Metaboli-

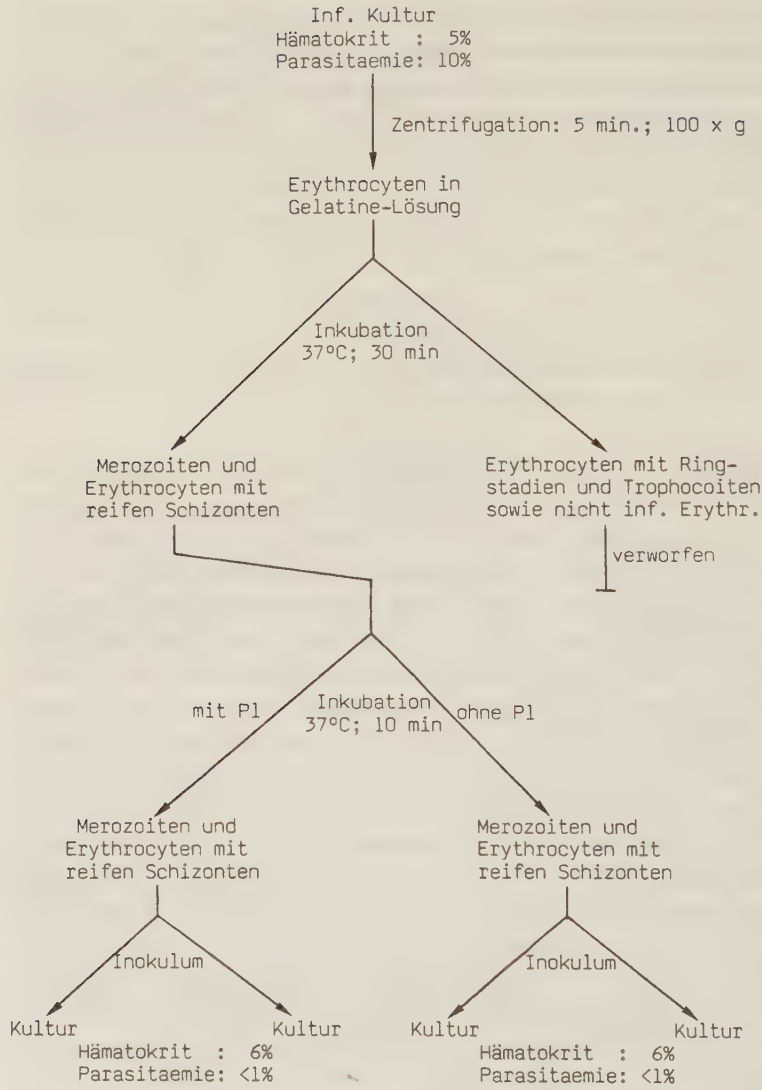


Abb. III.14: Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Infektiosität von Merozoiten und reifen Schizonten (Plasmodium falciparum) in in vitro - Kulturen nach Pl-Behandlung.

sierung und die hohe Toxizität verhindern aber auch hier den sinnvollen Einsatz von Pentalenolacton unter in situ - Bedingungen.

Versuchstag	Inokulum ohne Pl		Inokulum mit Pl	
	Kultur I	Kultur II	Kultur III	Kultur IV
1.	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
	nur Erys mit reifen Schizonten und Merozoiten			
2.	4 %	3,5 %	keine inf. Erythr.	
	nur Ringstadien			
3.	5 %	4 %	keine inf. Erythr.	
	90 % Trophoz., 10 % Ringe			
4.	10 %	10 %	keine inf. Erythr.	
	starke Lyse			

Tab. III.4: Parasitaemie-Verlauf in in vitro - Kulturen von Plasmodium falciparum. Die Infektion der Kulturen erfolgte mit Merozoiten und reifen Schizonten, die vor der Infektion mit, bzw. ohne Pl inkubiert worden waren.

5. Diskussion

Ziel der hier durchgeführten Versuche war in erster Linie, den Beweis zu führen, daß Pentalenolacton für die Anwendung auf ganz unterschiedliche Eukaryonten-Zelltypen geeignet ist, um die Glykolyse in diesen in vivo - Systemen definiert zu unterbinden. Für einen solchen Inhibitor muß gefordert werden, daß er unter physiologischen Bedingungen in die Zellen eindringt und auf andere Stoffwechselleistungen bzw. Zellfunktionen keinen Einfluß hat. Das Eindringen von Pl in die Zellen läßt sich leicht an der Wirkung ablesen, nämlich Hemmung des Glucose-Verbrauchs sowie der Lactat-Bildung. Dieser Effekt würde aber auch auftreten, wenn Pl das Glucose-Transportsystem der Zellen blockieren würde. Hier konnte jedoch schon Hartmann zeigen, daß eine solche Beeinflussung nicht vorliegt (17). Zudem kommt es -wie die hier vorliegenden Arbeiten belegen- zu einer intrazellulären Hemmung der GAP-DH sowie zu einem Anstau von Dihydroxyaceton-Phosphat und von Fructose-1,6-Bisphosphat. Es ist unwahrscheinlich, daß für den Eintransport von Pentalenolacton in die Zellen ein vorhandenes Transportsystem "mißbraucht" werden könnte, da aufgrund der Pl-Struktur keine Ähnlichkeiten mit bekannten Metaboliten des Intermediärstoffwechsels zu bestehen scheinen. Gegen eine solche Möglichkeit spricht insbesondere aber auch das rasche Eintreten der Pl- Wirkung, die unter in vivo - Bedingungen quasi momentan nachweisbar ist. Darum scheint hier eine nicht katalysierte Diffusion weit eher wahrscheinlich. Eine massive Störung der Membranintegrität, die zu einer spontanen Lyse der Zellen führen würde, ist bislang noch niemals aufgetreten.

Es ist natürlich nicht möglich, im Einzelnen zu untersuchen, ob neben der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase auch noch weitere Enzyme bzw. Zellfunktionen geschädigt werden. In den Fällen, wo ausgewählte Enzyme des Intermediärstoffwechsels bislang getestet wurden (17; Zdunek, unveröffentl.), ist allerdings noch nie eine signifikante Inaktivierung mit Pl-Konzentrationen -die zur vollständigen GAP-DH - Hemmung ausreicht- beobachtet worden. Der Nachweis der Spezifität von Pl kann folglich nur an intakten Zellen geführt werden, wenn man durch geeignete Substratsupplementierungen die GAP-DH - Hemmung umgeht, und die Zellen unter diesen Bedingungen weiterhin lebensfähig bleiben. Das geht aber

nur dann, wenn die Glykolyse für den Energie-Stoffwechsel der Zellen nicht essentiell ist, da weder ATP, noch phosphorylierte Glykolyse-Metabolite die Zellwand penetrieren können. Der Nachweis der selektiven Pl-Wirkung konnte an Hepatocyten-Zellkulturen erbracht werden. Allerdings sind Hepatocyten in Kultur nicht teilungsfähig, so daß aus diesen Versuchen eine Pl-Wirkung auf die DNA-Replikation bzw. die Zellteilungsvorgänge nicht ausgeschlossen werden kann. Frühere Versuche von S. Hartmann mit Bakterienkulturen (17) zeigen aber, daß zumindest für Prokaryonten eine Pl-Schädigung in diesem Bereich ebenfalls nicht besteht. Es wird am Beispiel von in vitro - Kulturen procyclischer Trypanosomen noch dargestellt werden, daß das auch für Eukaryonten gilt.
Wie die Untersuchungen mit Ehrlich Ascites Tumor Zellen und mit Pl. vinckei bzw. Pl. falciparum zeigen, ist Pentalenolacton sehr gut geeignet, um die Bedeutung der Glykolyse für verschiedene Zelltypen aufzuklären. So ist zwar seit langem bekannt, daß in EAT-Zellen unter bestimmten Bedingungen die Atmungsfähigkeit gesteigert werden kann, die hier ausgeführten Untersuchungen an in vitro - Kulturen belegen jedoch, das die Glykolyse nicht durch eine gesteigerte Atmungsaktivität kompensiert werden kann. Vielmehr muß man annehmen, daß eine funktionierende Glykolyse für diese Zellen essentiell ist. Es wäre interessant, auch andere Tumorzellen auf dieses Verhalten hin zu testen.
Untersuchungen zum Energiestoffwechsel von Plasmodien sind besonders schwierig zu beurteilen, da der Erythrocyten-Stoffwechsel nicht ohne weiteres eliminiert werden kann. Auch ist es bislang nicht gelungen, alle Glykolyse-Enzyme gleichzeitig in einer Spezies nachzuweisen (Glycosomen, wie sie in Trypanosomen vorkommen, existieren offenbar hier nicht (98)). So war auch in diesem Fall -obgleich starke Evidenzen für eine ausgeprägte Glykolyse-Tätigkeit der Plasmodien bestehen- die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für die Parasiten nicht zweifelsfrei abzuschätzen. Durch Anwendung von Pentalenoalcton konnte nun erstmals eindeutig belegt werden, daß die Glykolyse (resp. der GAP-DH - Schritt) für Plasmodien essentiell ist, und zwar sowohl für die intraerythrocytären Stadien, als auch für freilebende Merozoiten.
Die Anwendung von Pentalenolacton unter in situ - Bedingungen zur Bekämpfung der Infektion ist allerdings, aufgrund der hohen Toxizität sowie der raschen metabolischen Inaktivierung der Verbindung, nicht sinnvoll und uneffektiv.

IV. Untersuchungen zum Energiestoffwechsel von Trypanosoma brucei

A. Einleitung

Im Laufe der hier vorgelegten Arbeit wurden verschiedene Eukaryonten-Zellsysteme eingesetzt und das jeweilige spezifische Zellverhalten auf Pentalenolacton-Belastung untersucht. Zum überwiegenden Teil wurden dabei Trypanosomen der Unterart Trypanosoma brucei brucei verwendet, wobei in einigen Fällen auch Versuche durchgeführt wurden, die nicht im ursächlichen Zusammenhang mit Pentalenolacton standen, und Aussagen über besondere Eigenschaften dieser Parasiten liefern sollten. Da Trypanosomen vielfach vom allgemein üblichen Zellverhalten in Bezug auf den Metabolismus und die molekularbiologische Organisation abweichen, scheint es sinnvoll, den eigentlichen Ergebnissen einen kurzen Abriß über Trypanosoma brucei voranzustellen. Dies umsomehr, als erst in jüngster Zeit interessante Details in der Literatur beschrieben wurden, die Trypanosomen zu einem überaus interessanten Versuchsobjekt werden lassen (106,123,146,169). Trypanosomen sind obligate Parasiten, die in allen Wirbeltierklassen vorkommen. Sie unterliegen einem Wirtswechsel, zumeist zwischen Wirbeltieren und Insekten. Die Gruppe der Trypanosomen umfaßt mehr als 100 Arten, wobei jedoch nur drei Vertreter aus zwei Arten humanpathogen sind: Trypanosoma cruzi (Erreger der Chargas-Krankheit in Süd- und Mittelamerika), sowie Trypanosoma brucei rhodesiense und Trypanosoma brucei gambiense, die zur Brucei-Artengruppe zählen (Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit). Zu dieser letztgenannten Artengruppe gehört auch Trypanosoma brucei brucei (T. brucei), das weder morphologisch, noch -soweit bekannt- in metabolischer oder molekularbiologischer Hinsicht von den übrigen Vertretern der Art abweicht. Es ist nicht humanpathogen, da im menschlichen Serum ein Faktor (ein Lipoprotein sehr hoher Dichte, vergl. 165) existiert, der auf diese Unterart lytisch wirkt. Zudem ist T. brucei auf Labortiere (Mäuse, Ratten etc.) übertragbar, so daß es ein ideales Versuchsobjekt für die gesamte Brucei-Gruppe darstellt. Im Rahmen dieser dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme von T. brucei eingesetzt.

Morphologie: Trypanosomen der Blutform (Abb. IV.1) besitzen eine charakteristische, spindelförmige Gestalt von etwa 25 µm Länge, deren Struktur

von parallel unter der Zellmembran verlaufenden Mikrotubuli gestützt wird (Cytoskelett). Die Geißel entspringt in der Nähe des Hinterendes in einer Membraneinstülpung (Flagellumtasche) und verläuft dann in regelmäßigen Abständen an die Zelloberfläche angeheftet nach vorn, wo sie frei beweglich über das Körperende hinausragt.

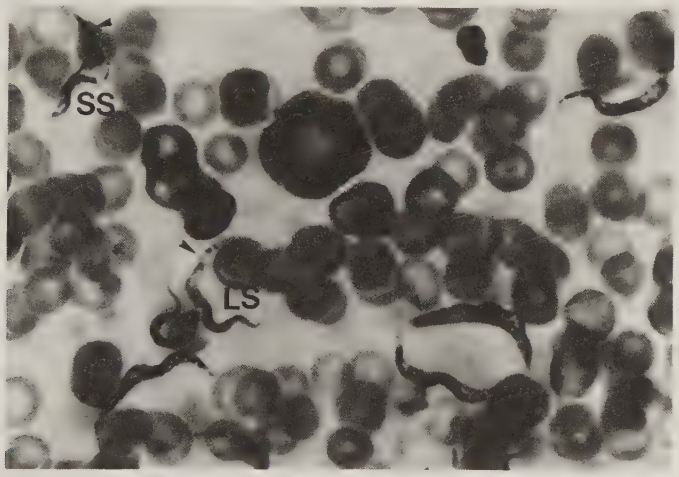


Abb. IV.1: Blutformen der Trypanosomen. Nach Giemsa gefärbter Blutausstrich, Endvergrößerung 1300:1. Man erkennt long slender-(LS) und short stumpy (SS)- Formen, sowie die Lage der Flagellum-Tasche (Pfeil).

Im Blut, bzw. in adäquaten Medien sind Trypanosomen außerordentlich agil, wobei durch die Tätigkeit der Geißel beständig wellenförmige Bewegungen über den Zelleib hinweglaufen. Im mikroskopischen Lebend-Präparat gewinnt man den Eindruck, daß es sich hier um eine "undulierende Membran" handelt. Das Flagellum besitzt den typischen "9+2"-Aufbau und ist nur in Abständen von etwa 95 nm durch elektronenoptisch dichte Strukturen mit dem Zellkörper verbunden. Diese Verküpfungspunkte "maculae adherentes" entsprechen funktionell den Desmosomen, sind allerdings kleiner als diese (Ø etwa 25 nm) und verbinden eben Teile derselben Zelle miteinander und nicht verschiedene Zellen. Im extrazellulären Flagellum verläuft parallel zu den beiden zentralen Mikrotubuli ein dreidimensionales Netzwerk "paraxial rod", dem vermutlich eine

Stützfunktion zukommt. Die Zelloberfläche der Trypanosomen -einschließlich Flagellum und Flagellumtasche- wird von einer gewöhnlichen Elementarmembran ("unit membran") umschlossen, auf die bei den Wirbeltierformen extern eine gleichmäßige, strukturlose Schicht von etwa 15 nm Dicke aufgelagert ist, die als "surface coat" bezeichnet wird. Dieser " surface coat" besteht aus Glykoproteiden, die Antigencharakter zeigen und austauschbar sind ("variable Antigene"). Die longitudinal dicht unterhalb der Zellmembran verlaufenden Mikrotubuli bilden eine geschlossene Reihe mit gleichmäßigen Abständen von etwa 25 nm, nur gegenüber dem Flagellum tritt eine Lücke von etwa 70 nm Breite auf, in der die maculae adherentes lokalisiert sind. In quergeschnittenen Trypanosomen findet sich bei Blickrichtung zum Vorderende hin (kenntlich durch die Lage der Subfibrillen im Flagellum) auf der linken Seite der Lücke stets ein Ausläufer des granulären endoplasmatischen Reticulums, der die pelliculären Microtubuli dort umfaßt (falgellum-associated reticulum = far).

Die Flagellum-Tasche ist ebenso wie die übrige Oberfläche -einschließlich Flagellum- mit dem surface coat ausgekleidet, und zuweilen erkennt man im Cytosol Vesikeln, die den Oberflächen-Coat gleichfalls besitzen. Es handelt sich hierbei um Abschnürungen der Flagellum-Tasche und es ist gesichert, daß auf diese Weise die Pinocytose größerer Moleküle (experimentell z.B. Ferritin) stattfinden kann (148).

In der Nähe des Geißel-Ursprungs findet sich stets ein DNA-haltiger Bereich, der früher als selbständiges Organell (Kinetosom, Kinetoplast, Blepharoplast) angesehen wurde. Heute weiß man, daß dieses Kinetosom Bestandteil des Mitochondriums ist, die DNA also eine spezielle Form von mitochondrialer DNA darstellt. Diese k-DNA besteht aus mehreren tausend "minicircles" mit jeweils etwa 1000 Basenpaaren und 20 - 50 "maxicircles" mit je 20 000 - 40 000 Basenpaaren. Alle Ringe sind dabei zu einem überraschend gleichförmigen dreidimensionalen Netzwerk mit einem Molekulargewicht von etwa 10^{10} verkettet, was interessante Phänomene bei der Replikation auslöst (123). Das Mitochondrium selbst, das stets nur in Einzahl vorkommt, besteht in der Blutform nur aus einem longitudinal verlaufenden Schlauch, in dem Membraneinstülpungen von " cristae typ" kaum vorhanden sind. (Zur Morphologie der Blutformen vergl. Abb. IV.2 und IV.3, sowie (176).)

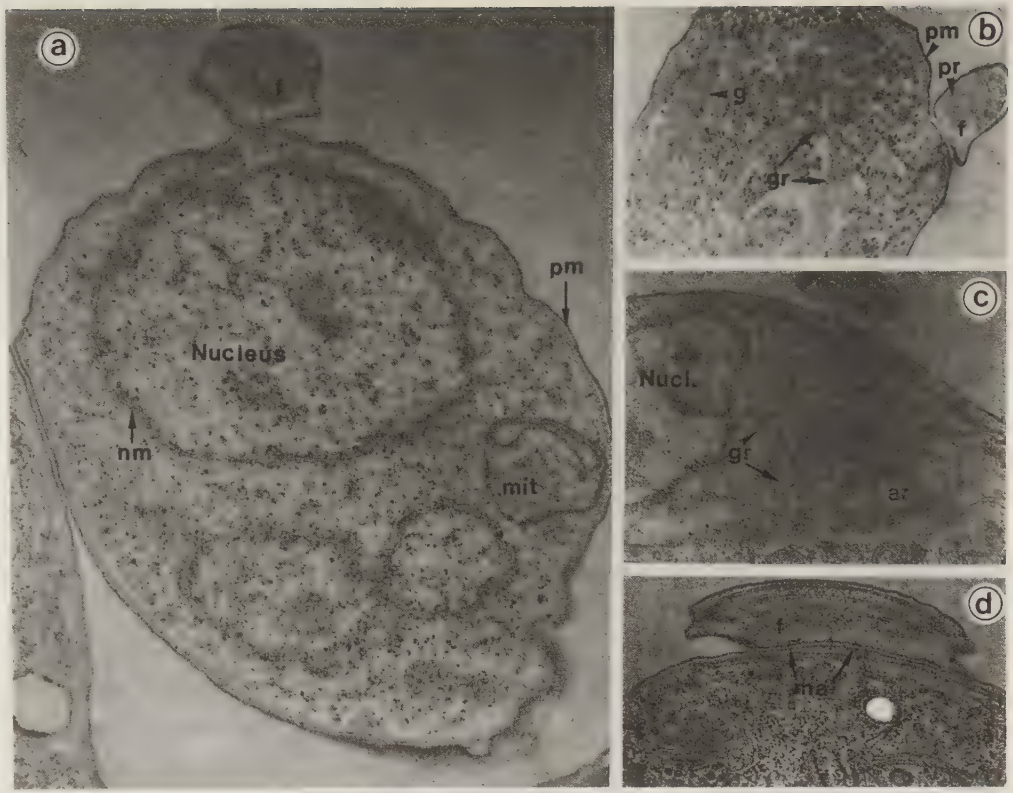


Abb. IV.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen.

a) Querschnitt durch ein Trypanosom. Man erkennt die Lage des Flagellums, den Kern mit der Kernhülle, sowie das Mitochondrium. Beachte, das eine geschlossene Reihe von pelliculären Mikrotubuli unterhalb der Oberfläche vorhanden ist. (Vergrößerung: 54ooo)

b) Wie oben. Man sieht die Geißel mit den 9 äußeren Doppel- und den 2 Zentralfibrillen ("9 + 2"- Muster) und dem "paraxial rod", sowie den Golgi-Apparat und granuläres endopl. Reticulum. (Vergrößerung: 45ooo)

c) Wie oben. Beachte die Anordnung des agranulären endopl. Reticul. (Vergrößerung: 5Oooo)

d) Längsschnitt durch ein Trypanosom. Man erkennt einen Teil der Geißel, die über maculae adherentes mit der Zelle verbunden ist. (Vergrößerung: 48ooo)

Abkürzungen: ar = agranuläres endoplasmatisches Reticulum, c = Oberflächencoat, f = Flagellum, ft = Flagellumtasche, far = Flagellum assoziiertes Reticulum, g = Golgi-Apparat, gr = granuläres endoplasmatisches Reticulum, k = Kinetosom

(Fortsetzung s. Abb. IV.3)

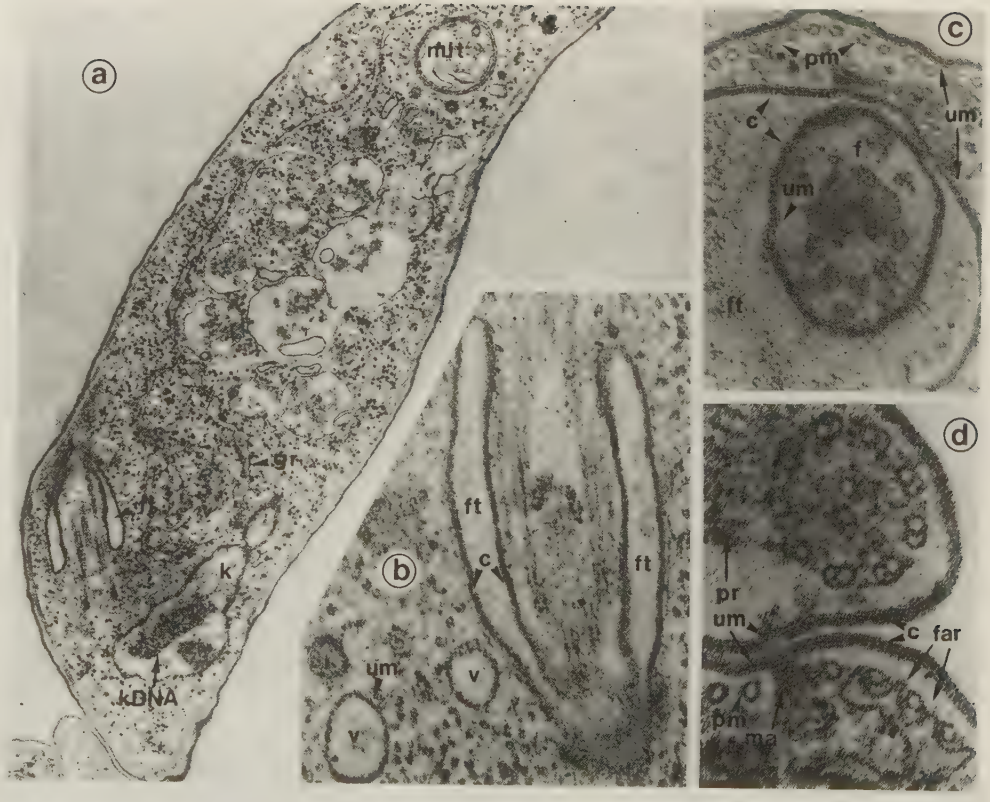
Abb. IV.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Trypanosomen.

a) Längsschnitt durch ein Trypanosom. Man erkennt die Flagellumtasche und das Kinetosom mit der kDNA. (Vergrößerung: 50ooo)

b) Ausschnittsvergrösserung der Flagellumtasche. Beachte die Auskleidung mit dem Oberflächencoat sowie die abgeschnürten Vesikeln, die die unit membrane außen, und den coat innen tragen. (Vergrößerung: 130ooo)

c) Querschnitt durch die Flagellumtasche. Man sieht, daß sowohl die Oberfläche, als auch die Flagellumtasche und die Geißel vom coat umhüllt sind. (Vergrößerung: 75ooo)

d) Ausschnittsvergrösserung der Geißel. Beachte den Verknüpfungspunkt zwischen Geißel und Zelloberfläche (macula adherens). (Vergrößerung: 170ooo).



kDNA = Kinetosomen-DNA, ma = maculae adherentes, mit = Mitochondrium, nm = Kernhülle (Nuclearmembran), pm = pelliculäre Mikrotubuli, pr = paraxial rod, um = unit membrane, v = Vesikeln.

Normalerweise treten im Blut lichtmikroskopisch deutlich unterscheidbare morphologische Varianzen auf, die man aufgrund ihrer Erscheinungsweise als "long slender" oder "short stumpy" bezeichnet. Long slender Trypanosomen bilden im Blut den Hauptanteil, da sie die am besten adaptierte Wirbeltierform darstellen. Dagegen ist die short stumpy Form als Übergangsstufe zur Insekten-Population aufzufassen, aus der nach dem Wirtswechsel im Fliegendarm die procyclischen Trypanosomen entstehen. Die Trypanosomen gelangen in der Fliege (Glossinen) nach einer Darmpassage (procyclische Trypanosomen) in die Speicheldrüse, wo sich zunächst die epimastigote Form und schließlich die für Wirbeltiere wieder infektiöse metacyclische Morphe ausbildet; procyclische und epimastigote Parasiten sind für Wirbeltiere nicht infektiös. Hält man Trypanosomen ausschließlich in Wirbeltierpassage, so verlieren die Flagellaten früher oder später die Fähigkeit zur Gestaltsveränderung (Pleomorphismus), so daß im Blut ausschließlich long slender Formen auftreten, wobei diese experimentell erzeugten monomorphen Parasiten nicht, bzw. nur unter gros-

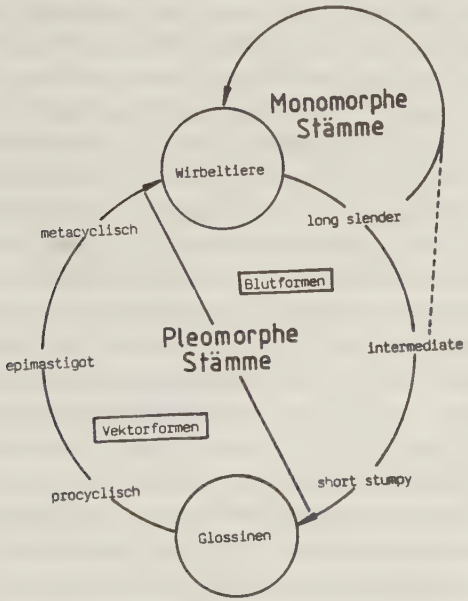


Abb. IV.4: Entwicklungscyclus pleomorpher und monomorpher Trypanosomen-Stämme.

sen Schwierigkeiten, auf den Vektor -also die Glossinen- übertragbar sind (101) (Abb. IV.4).
Will man pleomorphe Trypanosomen im Labor erhalten, so muß man von Freilandformen sofort oder nach wenigen Labortierpassagen Stabilate anlegen, oder in regelmäßigen Abständen Glossinenpassagen durchführen. Monomorphe Stämme (STIB 427, H 81 A) unterscheiden sich von den pleomorphen durch eine enorm gesteigerte Virulenz für Labortiere: während pleomorphe Parasiten in etwa 4 - 6 Wochen zum Tod der Mäuse führten, wobei die Trypanosomendichte im Blut starken Schwankungen unterlag und zwischenzeitlich gar keine Flagellaten ausgezählt werden konnten, stieg bei monomorphen Trypanosomen die Parasitaemie mit einer Generationszeit von etwa 5 h kontinuierlich an, was innerhalb von 3 - 4 Tagen den Tod der Tiere zur Folge hatte.

Variable Antigene: Trypanosomen der Brucei-Gruppe leben in allen Phasen ihres Lebenscyclus -im Gegensatz zu T. cruzi- extrazellulär. Sie benötigen darum ein spezielles System, um der Immunabwehr der Wirbeltierwirte zu entgehen; aus diesem Grunde haben sie ein raffiniertes Verfahren entwickelt, um ihre Oberflächen-Antigene austauschen zu können ("variable Antigen type" ≙ VAT). Diese variablen Antigene sind Glykoproteide ("variable surface glycoprotein" ≙ VSG) mit einem Molekulargewicht von etwa 65 000 (118, 167, 177). Bei den bisher untersuchten VSG besteht der Kohlenhydratanteil aus den Zuckern Galaktose, Mannose und Glucosamin, während die Polypeptidkette aus etwa 600 Aminosäureresten aufgebaut ist. Sowohl im Kohlenhydratanteil, der etwa 7 % - 17 % ausmacht, als auch in der Aminosäurenzusammensetzung treten weitgehend Variationen auf (102, 143). Allerdings scheinen im VSG zwei unterschiedliche Domänen zu existieren, die z.B. durch Proteaseeinwirkung getrennt werden können. Der dabei freigesetzte N-terminale Anteil besitzt ein Molekulargewicht zwischen 40 000 und 50 000; in diesem Fragment finden sich keine signifikant homologen Sequenzen (144). Hingegen konnten im C-terminalen Fragment, in dem auch der Kohlenhydratanteil lokalisiert ist (140), wesentliche Sequenz-Homologien aufgezeigt werden (105, 140, 164). Aufgrund der geschilderten, sowie einer Vielzahl weiterer Einzelergebnisse ergibt sich nun ein Konzept, wie der "surface coat" auf molekularer Ebene organisiert sein könnte. Er besteht aus identischen Glykoproteiden, die als Monolayer angeordnet das gesamte Trypanosom umhüllen. Jedes VSG

besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlicher Funktion. Der C-terminale Teil besitzt bei unterschiedlichen VSG aufgrund homologer Abschnitte über größere Bereiche eine ähnliche Konformation, so daß vermutlich alle VSG auf gleiche Weise in oder auf der Membran verankert werden können. Die nach außen gerichtete N-terminale Domäne weist hingegen keine Sequenzhomologien auf und ist Träger der Antigen-Spezifität (123). In einem gegebenen Stamm existiert die genetische Information für mehr als 100 VAT, deren Struktur so unterschiedlich ist, daß ein Antikörper gegen ein definiertes VSG nicht mit anderen Glykoproteiden kreuzreagiert (115). Für einige VAT konnte dabei gezeigt werden, daß vor der eigentlichen Expression von dem zugehörigen Gen ("basic copy ") eine Expressions-Matritze (" expression linked copy ") angelegt und an einem zur Transcription geeigneten Ort (" expression site") translociert wird (137). Aufgrund eines bislang nicht bekannten Vorganges oder Signals kann ein Trypanosom seinen "surface coat" abbauen oder verlieren und durch ein neues VSG ersetzen. Auf diese Weise können in einer gegebenen Parasitaemie durch die Immunantwort des Wirtes mehr als 99,9 % der Parasiten, die den gleichen VAT besitzen (Homotyp), zugrunde gehen, während die restlichen Individuen VAT besitzen, gegen die noch kein Antikörper existiert und die so zum Ausgang einer neuen Population werden (Heterotypen)(177). Die Reihenfolge, in der die verschiedenen Glykoproteide gebildet werden, ist wohl nicht streng festgelegt, dennoch scheinen einige VAT stets in einem frühen Stadium der Parasitaemie ausgebildet zu werden, während andere immer erst spät entstehen (153, 154). Man diskutiert, ob dieses Phänomen ebenfalls zum "survival-Programm" der Trypanosomen gehört, da so verhindert wird, daß zufällig bereits frühzeitig alle VAT entstehen könnten und sich eine effektive Immunität des Wirtes entwickeln würde (106, 123).

Nach Aufnahme der Wirbeltier-Trypanosomen durch die Fliege geht der surface coat ebenfalls verloren und erscheint erst wieder, wenn in der Speicheldrüse die metacyclische Form entsteht. Entgegen einer früher häufig geäußerten Hoffnung, daß hier ein " basic antigen" gebildet werden könnte, gegen das ein protektiver Immunschutz möglich wäre, ließen sich aber auch hier bereits mehrere VAT nachweisen (124, 152), wobei sich über die Gesamtzahl der metacyclischen VAT bisher keine Aussagen machen lassen.

Biochemische Aspekte des Trypanosomen-Stoffwechsels: Noch immer sind die biochemischen Leistungen der Trypanosomen wenig untersucht und allenfalls bruchstückhaft bekannt. Es wird an dieser Stelle darum nur eine Zusammenfassung des Energiestoffwechsels dargestellt, der übrige Intermediär-Stoffwechsel bleibt dagegen unberücksichtigt (vergl. aber 107, 120, 146, 163). Der Energie-Metabolismus ist bei T. brucei nicht einheitlich und differiert sehr stark zwischen der Wirbeltier- und der Vektor-Form. Bei den Blutformen existieren zudem geringe Unterschiede zwischen der long slender- und der short stumpy -Variation. Long slender-Trypanosomen sind in ihrem Energie-Stoffwechsel vollständig auf fermentierbare Substrate (Glucose, Glycerin etc.) angewiesen, die sie quasi quantitativ in Pyruvat überführen. Intrazelluläre Energie-Reserven bestehen dabei offenbar nicht, denn die Flagellaten werden nach Entfernen der Substrate binnen weniger Minuten unbeweglich und gehen zugrunde (168). Da den Zellen die Lactat-Dehydrogenase (127) und ein funktionierender Citratcyclus (107) fehlt, ist Pyruvat das Endprodukt der Glykolyse und wird ins Medium abgegeben. In den short stumpy- Formen konnten zwar alle Enzyme des Krebs-Cyclus nachgewiesen werden, dennoch scheint er auch hier nicht funktionstüchtig zu sein, da die überaus geringen Konzentrationen an Citrat-Synthetase und Succinat-Dehydrogenase limitierend wirken. Immerhin findet man hier neben Pyruvat zwar geringe, aber doch meßbare Mengen an Acetat, Succinat und CO_2 (107).
Unter aeroben Bedingungen haben die Blutformen einen erheblichen Sauerstoffverbrauch, dennoch sind sie völlig unempfindlich gegen Cyanid, sogar bis zur Konzentration von 10 mM (108). Zudem konnte gezeigt werden, daß die Trypanosomen überhaupt keine Cytochrome enthalten (129,175). Mittlerweile wurde jedoch durch die Arbeiten von Grant und Sargent (132), sowie einer Arbeitsgruppe um Opperdoes (156 - 158, 178) klar, auf welche Weise Glykolyse und Atmung bei Wirbeltier-Trypanosomen organisiert sind. Im Cytoplasma existieren microbody-artige Organellen, in denen die Glykolyse-Enzyme von der Hexokinase bis zur Phosphoglycerat-Kinase und zur Glycerin-Kinase vornehmlich lokalisiert sind, nämlich zu 77 % - 94 %. Da diesen Organellen typische microbody- und peroxisomale Enzyme fehlen, hat Opperdoes die Bezeichnung "Glycosomen" vorgeschlagen. Aufgrund seiner Untersuchungen bestehen Evidenzen dafür, daß die Glycosomen-Membran eine Permeabilitäts-Barriere darstellt, die nur für die Substrate

Glucose bzw. Glycerin gut durchlässig ist, während NAD/NADP, Adenin-Nucleotide und phosphorylierte Glycolyse-Zwischenprodukte nicht passieren können. Für den notwendigen Transport von 3-Phosphoglycerat (3-PG), Glycerin-3-Phosphat (GP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und anorganischem Phosphat fordert er darum "shuttle"-Mechanismen. Da unter aeroben Bedingungen Glucose quantitativ in Pyruvat überführt wird, ist es notwendig, das entstandene NADH wieder zu oxidieren, was mit Hilfe der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase ebenfalls innerhalb der Glycosomen geschieht. Das so gebildete Glycerin-3-Phosphat wandert dann in das Pro-Mitochondrium der Trypanosomen, wo die Reduktionsäquivalente durch die Glycerin-3-Phosphat-Oxidase auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Trypanosomen-Atmung). Durch Rücktransport des Dihydroxyacetonphosphats in die Glycosomen wird der Cyclus geschlossen (Abb. IV.5). Zum vollständigen Umsatz von Glucose in Pyruvat ist die Oxidase-Aktivität unabdingbar.

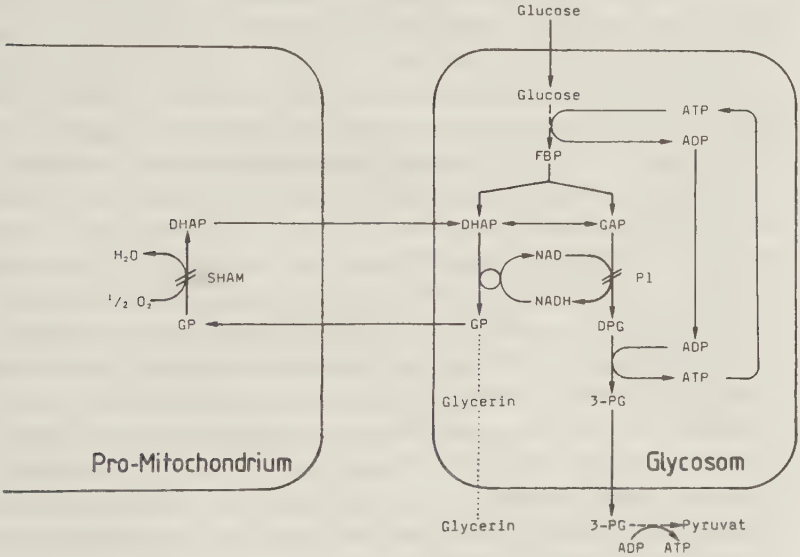


Abb. IV.5: Schematische Übersicht zum Ablauf der Glycolyse und der Trypanosomen-Atmung in den Blutformen (nach: 159).

Der molekulare Mechanismus dieser Umsetzung ist bislang ungeklärt, offenbar erfolgt er ohne ATP-Gewinn. Das Enzym ist insensitiv gegen Amytal, und auch Cyanid, Azid und Kohlenmonoxid beeinträchtigen die Oxidase-Aktivität nicht (vergl. 132). Dagegen wird es jedoch von p-Chloro-

mercuribenzoat und H_2O_2, sowie insbesondere von Hydroxamsäuren, namentlich Salicylhydroxamsäure (SHAM) inhibiert (125, 155). Bei Anwendung von SHAM auf Blutformen-Trypanosomen kommt es zu einem interessanten Phänomen: die Trypanosomen gehen nicht zugrunde, und aus Glucose wird zu gleichen Anteilen Pyruvat und Glycerin gebildet (125). Der gleiche Effekt ergibt sich auch unter anaeroben Bedingungen (110, 131). Diese Ergebnisse führen zu der überraschenden Tatsache, daß Trypanosomen eine solche Prozedur offenbar überleben können, obgleich durch die Glykolyse kein Netto-ATP-Gewinn möglich scheint. Hammond und Bowman (113) haben hier allerdings die Möglichkeit aufgezeigt, daß bei Trypanosomen die Glycerin-Kinase bei der Bildung von Glycerin ATP erzeugen könnte, obwohl diese Reaktion üblicherweise durch Abspaltung von anorganischem Phosphat erfolgt. Auf diese Weise würde pro Mol Glucose immerhin 1 Mol ATP gewonnen. Andererseits haben Gilbert und Klein gezeigt, daß Carnitin die ATP-Synthese in T. brucei zu stimulieren vermag (130). Die Autoren zogen daraus den Schluß, daß hier eventuell eine Substratketten-Phosphorylierung stattfinden könnte, die das hohe Gruppen-Übertragungspotential von Acetylcarnitin ausnutzt. Eine endgültige Klärung, ob die Glykolyse allein zur Energie-Versorgung der Blutformen essentiell ist, oder ob doch alternative Stoffwechselleistungen einen signifikanten Beitrag leisten, kann folglich nur mit einem selektiven Glykolyse-Hemmer erbracht werden.

Wie bereits ausgeführt, lassen sich bei der short stumpy-Form -im Gegensatz zu long slender- Trypanosomen- bereits alle Citratcyclus-Enzyme nachweisen, wenn auch hier der geschlossene Cyclus noch nicht aktiv ist. Entsprechend findet man hier eine Zunahme der intramitochondrialen Strukturen, so daß im Elektronenmikroskop bereits deutlich "cristae "-Strukturen auffindbar sind. Wirklich drastische Veränderungen finden aber statt, wenn im Fliegendarm die procyclische Morphe entsteht. Hierbei verschwindet der surface coat und die Mitochondrien sind gut ausgebildet und enthalten reichlich "cristae" (176). Es konnte gezeigt werden, daß die maxicircles der k-DNA zumindest einen Teil der genetischen Information tragen, die zur Mitochondrien-Aktivierung notwendig ist (138). Die Funktion der minicircles ist bislang nicht bekannt, es sind jedoch noch zu keiner Phase des Lebenscyclus der Trypanosomen Transcriptionsprodukte aufgefunden worden. Lichtmikrosko-

pisch sind die Trypanosomen ebenfalls gut zu unterscheiden, da sie erheblich länger sind als long slender -Blutformen, und die Flagellumtasche fast in der Mitte der Zelle mündet. Procyclische Trypanosomen besitzen einen voll ausgebildeten Citratcyclus und eine komplette cyanidsensitive Atmungskette (156). Glucose wird in diesen Formen vornehmlich zu Succinat, Acetat und CO_2 umgewandelt, in der Fliege werden als Hauptenergiesubstrate aber wohl Aminosäuren, vornehmlich Prolin -das in der Hämolymphe der Glossinen reichlich enthalten ist- verstoffwechselt (107). Unter diesen Bedingungen müßte der Einsatz eines Glykolyse-Inhibitors also folgenlos für die Trypanosomen bleiben.

In vitro - Kultivierung der Trypanosomen: Es wurde bereits früh versucht, Trypanosomen auch außerhalb von Labortieren unter in vitro - Bedingungen zu kultivieren. Hier schlugen aber lange Zeit alle Bemühungen fehl, da die Parasiten entweder zugrunde gingen, oder zu procyclischen Mitteldarmformen der Insekten transformierten. Diese waren dann unter geeigneten Bedingungen allerdings quasi unbegrenzte Zeit in Kultur zu halten (119, 157, 172, 173).
Einen ersten Teilerfolg bei der Kultivierung der Blutform erzielte dann zwar LePage (151) durch die Verwendung eines feeder layers aus Säugetier-Zellen. Dennoch dauerte es weitere 10 Jahre, bis es Hirumi et al. gelang, die ersten kontinuierlichen Kulturen von Trypanosomen der Blutform zu etablieren (136). Hirumi verwendete als feeder layer fibroblasten-artige Zellen eines Rindes in RMPI-1640-Medium mit 20 % foetalem Rinderserum. Hill et al. gelang dann ebenfalls die in vitro - Kultivierung infektiöser Wirbeltierformen bei Verwendung eines feeder layers aus fibroblastoiden Lungenzellen im gleichen Medium. Obgleich diese Versuche als Durchbruch zu bewerten sind, erlaubten sie doch nur die Kultivierung von wenigen monomorphen Stämmen, während vorallem pleomorphe Stämme in diesem System nicht gezüchtet werden konnten. Hier entwickelte schließlich Brun et al. ein Kultivierungssystem, in dem monomorphe ebenso wie pleomorphe Stämme der gesamten Brucei-Artengruppe erfolgreich kultiviert werden können. Als feeder layer verwendeten sie fibroblastoide Embryonalzellen von Kaninchen bzw. einer Wühlmaus-Art (Microtus montanus) und das RPMI-Medium wurde durch minimum essential medium (MEM) mit EARLE´s Salzen ersetzt (113).

B. Spezielle Methoden

1. Handhabung der Trypanosomen in in situ - Versuchen

Für in situ - Versuche wurden in der Regel weibliche NMRI-Mäuse mit einem Gewicht von etwa 25 g und in einigen wenigen Fällen männliche Ratten der Rasse Spague Dawley mit einem Gewicht von ca. 300 g eingesetzt. Als Inokulum diente infiziertes Blut von einem Spendertier, Stabilate oder eine Probe aus einer in vitro - Kultur. Die Menge der dabei überimpften Trypanosomen ist unkritisch, da bereits eine sehr geringe Anzahl von Parasiten zur Infektion führt. Üblicherweise wurde infiziertes Vollblut 1 : 200 und Stabilat 1 : 5 mit Sucrose-Citrat-Lösung verdünnt und den Tieren in 200 µl Portionen intraperitoneal appliziert; in vitro - Kulturen wurden unverdünnt eingesetzt.
Zur Kontrolle der Parasitaemie wurde den Tieren -durch Kappen der Schwanzspitze- wenig Blut aus der Schwanzvene entnommen und je nach dem Grad der Parasitaemie zwischen 1 : 50 und 1 : 200 mit SC-Lösung verdünnt. Die Trypanosomen wurden dann in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierbei zeigte sich allerdings, daß die Flagellaten in der üblicherweise verwendeten Zählkammer-Ausführung mit der Tiefe von 0,1 mm einen sehr großen Bewegungsspielraum besitzen, so daß die Zellbestimmung nicht nur außerordentlich mühsam, sondern auch sehr ungenau wurde. Es wurde darum eine Kammer mit einer Tiefe von nur 0,02 mm verwendet, die sich für diese Zwecke ausgezeichnet bewährt hat. In Fällen sehr geringer Parasitaemie ($> 1 \times 10^6$ Tryp./ml) wurden jedoch nach Giemsa gefärbte Ausstriche bzw. Präparate nach der Methode des "dicken Tropfens" (s. allgem. Methoden) angefertigt.

2. Isolierung der Trypanosomen aus dem Blut

Zur Isolierung der Trypanosomen werden gewöhnlich zwei Methoden angewendet, die zu Beginn dieser Arbeit beide eingesetzt wurden. Die erste Technik ist dabei ein einfacher Zetrifugationsschritt, bei dem das infizierte Blut einer niedrigen g-Zahl ausgesetzt wird. Aufgrund der relativ hohen Dichte der Erythrocyten und anderer Blutzellen sedimentieren diese sehr schnell, während sich die Trypanosomen im Überstand anreichern. Die dabei notwendige Umdrehungsgeschwindigkeit ist naturgemäß von der jewei-

ligen Verdünnung des Blutes abhängig und muß empirisch ermittelt werden. Man verwendet den Überstand und wäscht die Trypanosomen zweimal mit dem Medium, mit dem der weitere Versuch durchgeführt werden soll. Der Vorteil dieser Technik ist die Schnelligkeit, mit der die Parasiten erhalten werden können. Nachteilig ist aber, daß eine erhebliche Kontamination mit anderen Blutzellen (z.B. Trombocyten, Lymphocyten etc.) unvermeidlich ist, und daß die Ausbeute an Trypanosomen relativ gering ist. Denn einerseits enthält das Zellsediment natürlich noch reichlich Parasiten, andererseits läßt sich der Überstand nicht wirklich quantitativ entnehmen, ohne daß dabei Erythrocyten aufgewirbelt werden. Die zweite häufig verwendete Isolierungstechnik beruht auf der Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen nach S.M. Lanham (149, 150). In der Originalarbeit wurde dabei DEAE-Cellulose verwendet, die in Phosphat-Saline-Glucose (PSG) - Puffer äquilibriert worden war. Hier werden die Blutzellen, die eine negative Oberflächenladung tragen, an das Säulenmaterial gebunden, während die Trypanosomen im Eluat erscheinen. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit habe ich stattdessen DEAE-Sephacel® verwendet, bei dem neben anderen Vorteilen keine Probleme mit "fines" auftreten können und höhere Flußraten als mit DEAE-Cellulose erreicht werden. Das vorgequollene Ionenaustauscher-Material wurde mit HEPES-Medium (pH 7.4, mit 10 mM Glucose) äquilibriert, und in einer Säule mit einem Durchmesser von 2 cm und einer Höhe von 6 cm eingesetzt. Die Kapazität dieser Säule reichte aus, um das Blut von drei Mäusen aufzutrennen. Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen und ständig im Mikroskop kontrolliert. Die trypanosomenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und zentrifugiert, dann wurden die Parasiten in einem definierten Volumen des jeweils gewünschten Mediums aufgenommen und in den Versuch eingesetzt. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Ausbeute, mit der Trypanosomen isoliert werden und die in der Regel außerordentlich geringe Kontamination mit anderen Blutzellen. Nachteilig ist neben dem relativ teueren Säulenmaterial vorallem der doch lange Zeitraum, der für die Isolierung benötigt wird, und der sich auf die Überlebensdauer der Trypanosomen-Suspension unvorteilhaft auswirkt. Aus diesen Gründen habe ich im Verlauf dieser Arbeit eine weitere Isolierungstechnik mit Ficoll-Paque® entwickelt, die dann durchgängig verwendet wurde, da die Abtrennung der Trypanosomen bei dieser Methode relativ schnell durchgeführt werden

konnte, nur sehr geringe Kontaminationen mit anderen Blutzellen aufwies und ausgesprochen hohe Trypanosomen-Ausbeute erlaubte (vergl. Ergebnisse). Die Blutentnahme erfolgte dabei so wie in Kapitel II beschrieben, wobei hier stets 4 ml Sucrose-Citrat-Blut entnommen wurden. Mit diesem SC-Blut wurden dann 3 ml Ficoll-Paque® , das bereits in einem Reagenzglas vorgelegt worden war, überschichtet. Alle verwendeten Glasgeräte (Reagenzgläser, Pasteurpipetten etc.) waren zuvor silikonisiert worden (s. allgem. Methoden im Anhang). Die Proben wurden 15 min. bei 800 x g zentrifugiert, wobei die Erythrocyten und die meisten anderen Blutzellen den Ficoll-Paque®-Layer penetrierten, während die Trypanosomen als distinkte Bande darauf pelletierten. Da die Trypanosomen-Bande vom Erytrocyten-Pellet durch das Ficoll-Paque® separiert war, ließ sie sich quantitativ abhebern, ohne daß Gefahr bestand, Erythrocyten aufzuwirbeln. Dieses Verfahren ließ sich auch in sehr kleinen Ansätzen (100 µl Ficoll-Paque® und 150 µl SC-Blut) durchführen, was für die in vitro - Kulturen vorteilhaft eingesetzt werden konnte. Die Parasiten wurden zweimal mit jeweils 10 ml Medium (zumeist HEPES-Medium mit 10 mM Glucose) kurz gewaschen und dann zu einer definierten Zelldichte im gewünschten Medium aufgenommen.

3. Anlegen von Trypanosomen-Suspensionen

Für die Versuche mit Trypanosomen-Suspensionen wurden die Parasiten beim letzten Waschvorgang in genau 10 ml aufgenommen, so daß die Gesamtausbeute daraus bestimmt werden konnte. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde das Trypanosomen-Pellet dann in soviel Volumen des jeweiligen Mediums aufgenommen, daß die gewünschte Zelldichte, zumeist 1 x 10^8 Tryp./ml resultierte. Aus diesem Gesamtansatz wurden Portionen von üblicherweise 1,5 ml in 25 ml Erlenmeyer-Kölbchen überführt, die dann bei 37°C und 65 rpm im Brutschrank inkubiert wurden. Zu einzelnen Ansätzen wurde in der Regel sofort Pentalenolacton aus einer Stammlösung zugesetzt; die dabei zwangsläufig eingeschleppte geringe Menge Alkohol erwies sich in Vorversuchen als unkritisch. Die Dauer der einzelnen Versuche gingen selten über 1 h hinaus, die Zeitpunkte der Probennahmen sind jeweils angegeben. Suspensionen wurden nur von monomorphen Trypanosomen angelegt.

4. In vitro - Kulturen der Blutform

Für die in vitro - Kultivierung von Trypanosomen der Blutform wurde das System von Brun und Jenni verwendet (113). Als feeder layer wurden dabei fibroblastoide Embryonalzellen einer Wühlmaus-Art (Microtus montanus) eingesetzt, die mir dankenswerterweise von R. Brun und L. Jenni vom Schweizerischen Tropeninstitut in Basel zur Verfügung gestellt worden waren. Die Kultivierung erfolgte in HEPES-gepuffertem "minimun essential medium" (MEM) mit EARLE's Salzen.

a) Kultivierung der Microtus-Zellen: Um stets ausreichende Mengen an fibroblastoiden Zellen für den feeder layer verfügbar zu haben, wurden diese Zellen in einem regelmäßigen Turnus subkultiviert. Dazu wurden Microtus-Zellen -entweder aus Stabilaten oder aus einer Kultur- im MEM-Kultivierungsmedium mit 10 % foetalem Rinderserum aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt. Hauptsächlich kamen dabei T-75-Flaschen zum Einsatz, in die jeweils etwa $1{,}5 \times 10^6$ Microtus-Zellen in 15 ml Medium ($\hat{=}$ 1×10^5 Zellen/ml) eingesät wurden. Daneben wurden in einigen Fällen auch T-25-Flaschen verwendet, in die etwa $0{,}8 \times 10^6$ Microtus-Zellen in 3 ml Medium eingebracht wurden. Die Flaschen wurden zumeist fest verschraubt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zuweilen wurde die Verschraubung aber auch so durchgeführt, daß ein Luftausgleich möglich war, wobei im Brutschrank zusätzlich definierte Begasungsbedingungen (Luft mit 5 % CO_2) eingehalten wurden. Dieses Verfahren brachte aber gegenüber dem ersten keinen erkennbaren Vorteil. Die Zellen setzten sich in den Flaschen relativ schnell ab und wuchsen innerhalb von 2 - 3 Tagen zu einem geschlossenen Zellrasen heran. Ohne Medienwechsel sind diese Kulturen etwa 8 - 10 Tage stabil, danach löst sich der Layer früher oder später von der Unterlage ab und die Zellen gehen zugrunde. Von dem Zeitpunkt an, wo die Kulturen konfluent werden, bis etwa zum 8. Tag nach Beginn der Kultivierung können die Zellen weiter verwendet werden: in der Regel wurden die Kulturen im Abstand von 1 Woche trypsiniert und neu ausgesät.

b) Trypsinierung des Zellrasens: Um die Zellen aus den Kulturflaschen wieder herauszulösen, wurde ein übliches Trypsinierungs-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und die Zellen

etwa 1 - 2 min. in EARLE´s balanced salt solution (EBSS) gewaschen. Anschließend erfolgte eine 15 - 20 min. Inkubation des Layers mit 15 ml Trypsin-Lösung (vergl. Anhang) bei 37°C im Brutschrank, wobei der Erfolg in regelmäßigen Abständen im umgekehrten Mikroskop (Diavert) kontrolliert wurde. Sobald sich die Zellen vereinzelt von der Unterlage abgelöst hatten, wurde die Trypsin-Behandlung durch Zugabe von 3 ml Trypsin-Inhibitor-Lösung bzw. 3 ml Serum gestoppt. Nach dem Zentrifugieren (10 min. bei 500 x g) der Suspension wurden die pelletierten Zellen in einem definierten Volumen Kultivierungsmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer mit gewöhnlicher Tiefe (0,1 mm) ausgezählt. Pro T-75-Flasche wurden dabei üblicherweise etwa 4-5 x 10^6 Microtus-Zellen erhalten, wobei der Vitalitätsindex -der mit dem Trypanblau-Ausschlußverfahren ermittelt wurde- gewöhnlich weit über 90 % lag. Die Zellen wurden nun wie oben beschrieben auf neue Kulturflaschen verteilt, bzw. für in vitro - Trypanosomen-Kulturen eingesetzt.

c) Anlegen von in vitro - Trypanosomen-Kulturen: Kulturen von Trypanosomen (Blutform) wurden fast ausschließlich in 24 well Tissue Culture Clusters durchgeführt. Dazu wurde pro well 1 ml einer Microtus-Fibroblastensuspension in Kultivierungsmedium mit 10 % foetalem Rinderserum eingesät, wobei die Zelldichte etwa 1 x 10^5 Zellen/ml betrug. Diese Kultivierungsgefäße wurden im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 bei 37°C inkubiert. Die Trypanosomen wurden dem feeder layer in der Regel etwa 24 h später zugesetzt, wenn der Zellrasen gerade konfluent wurde. Dazu wurde das überstehende Medium abgesaugt und durch frisches Kultivierungsmedium mit 15 % hitzeinaktiviertem Kaninchenserum ersetzt. Anschließend wurde ein Inokulum von etwa 1 x 10^5 Trypanosomen/well eingebracht und die Kulturen unter den genannten Brutschrank-Bedingungen weiterinkubiert. Die Trypanosomen "tauchen" in diesem System sofort zum feeder layer hinunter und wachsen zwischen den Fibroblasten bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft darüber.
Während der Kultivierung erfolgte ein täglicher Medienwechsel, wobei der größte Teil des Mediums vorsichtig (ohne die Trypanosomen aufzuwirbeln) abgesaugt und durch frisches ersetzt wurde. Waren aber die Trypanosomen bereits optimal angewachsen, so daß sie dichte "cluster" bilden und den feeder layer fast vollständig bedeckten, so wurde beim Medienwechsel durch leichtes Aufwirbeln dafür gesorgt, daß die meisten Para-

siten mit dem Medium entfernt wurden. Die verbleibenden Trypanosomen dienten dann als Inokulum für eine weitere Kultur.
Zum Start einer Kultur wurden die Trypanosomen entweder aus einer möglichst hoch infizierten Maus oder aus Stabilaten entnommen. Zur Isolierung der Parasiten aus dem Blut wurde dabei häufig ein Mikroansatz der Ficoll-Paque®-Methode durchgeführt, wobei 100 µl Ficoll-Paque® in ein steriles und silikonisiertes Reagenzglas mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Höhe von 20 mm vorgelgt und mit 150 µl SC-Blut überschichtet wurde. Das Einfüllen erfolgte mittels einer handelsüblichen 1 ml-Spritze und Kanüle. Diese Mini-Reagenzgläser wurden in Kunststoff-Reagenzgläser hineingestellt und wie üblich zentrifugiert. Der Trypanosomen-Layer wurde wiederum mit einer Kanüle abgehebert, einmal mit Kultivierungsmedium gewaschen und schließlich als Inokulum verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in diesen Fällen in einer Sterilbank, wobei die Sucrose-Citrat-Lösung sterilfiltriert wurde; die Ficoll-Paque®-Lösung wird handelsüblich steril geliefert. Stabilate wurden zumeist 1 : 20 mit Kultivierungsmedium verdünnt und dann direkt als Inokulum verwendet. Da ich Trypanosomen-Stabilate stets mit Glycerin statt mit DMSO angefertigt habe, war ein Entfernen der Einfrierlösung nicht nötig. Die Zelldichte in den Stabilaten lag bei etwa 1×10^8 Trypanosomen/ml. Somit mußten bei 20facher Verdünnung etwa 20 µl pro well eingesetzt werden, um ein Inokulum von 1×10^5 Parasiten/well zu liefern. In vitro - Kulturen wurden sowohl von dem monomorphen Stamm (STIB 427) als auch von den pleomorphen Stämmen (STIB 247, STIB 366) angelegt.

d) Trypanosomen-Kulturen mit Hepatocyten als feeder layer: In einigen Fällen wurde auch versucht, statt der Microtus-Zellen Hepatocyten als feeder layer zu verwenden. Als Kulturgefäße kamen dabei sowohl 24 well-Tissue Culture Cluster als auch Petrischalen (Ø 2,5 cm) zum Einsatz, die vor Gebrauch stets kollagenisiert wurden. Pro well wurde 0,2 ml und pro Petrischale 2,5 ml Hepatocyten-Suspension in W/AB 77-Medium mit Insulin und Dexamethason in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingesät. Zum Absetzen der Zellen wurden die Kulturgefäße 45 min. bei Raumtemperatur ohne CO_2-Begasung inkubiert, dann erfolgte der erste Medienwechsel mit Leibovitz L-15-Medium, das ebenfalls Insulin und Dexamethason sowie 10 % Kaninchenserum, 1% Glutamin und 1% Gentamycin enthielt. Pro well

wurden dabei 500 µl eingesetzt, während das Volumen in den Petrischalen bei 2,5 ml belassen wurde. Die Inkubation der Kulturen erfolgte dann unter den üblichen Brutschrank-Bedingungen, allerdings ohne CO_2-Begasung. Die Trypanosomen wurden etwa 5 h später zugesetzt, wobei pro well 1 x 10^5 und pro Petrischale 2,5 x 10^5 Trypanosomen eingebracht wurden. Die Inkubationsbedingungen wurden beibehalten, es erfolgte ein täglicher Medienwechsel.

5. In vitro - Kulturen von procyclischen Trypanosomen

Wie bereits dargelegt wurde, kann man procyclische Trypanosomen ohne feeder layer kultivieren, was den experimentellen Aufwand erheblich vereinfacht. Die Kultivierung wurde in T-25-Flaschen durchgeführt, die im Dunkeln bei 27°C inkubiert wurden. Es kam in der Regel ein semi-definiertes Medium (SDM-77) nach Brun und Jenni (111) mit 3 mM Citrat zur Anwendung. Der Zusatz von Citrat führt dabei zu einer erheblichen Beschleunigung der Transformation von der Blutform zur procyclischen Morphe (114). In einigen Fällen wurde auch SDM 79 (112), ebenfalls mit Citrat-Zusatz verwendet, das freundlicherweise von Prof. Overath zur Verfügung gestellt worden war. Zum Start einer procyclischen Kultur wurden pleomorphe Trypanosomen-Stämme (STIB 366, STIB 247) aus einer infizierten Maus oder Stabilate verwendet, wobei eine Anfangsdichte von etwa 1x10^6 Trypanosomen/ml eingestellt wurde. Die Kulturflaschen enthielten jeweils 3 ml Medium. Zur Kontrolle wurden die Flagellaten in regelmäßigen Abständen im umgekehrten Mikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung beobachtet. Sobald eine genügend dichte Population herangewachsen war, wurden die Trypanosomen zentrifugiert (10 min. bei 800 x g), in 9 - 15 ml frischem Medium aufgenommen und in 3 ml Portionen auf neue T-25-Kulturflaschen verteilt.

6. Gewinnung von Kaninchenserum

Das für die in vitro - Kultivierung der Blutformen benötigte Kaninchenchenserum wurde frisch bereitet, da entsprechendes käufliches Serum für diesen Zweck ungeeignet ist (R. Brun, mündl. Mitteilung). Es wurden drei adulte Tiere gehalten, denen im Abstand von frühestens 1 Monat jeweils 45 - 50 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und in Monovetten® aufgefangen

wurde. Zur vollständigen Koagulation wurde das Blut 1 Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht im Kühlraum stehen gelassen. Das Serum wurde abgepreßt, sterilfiltriert und 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Bis zum Gebrauch wurde das Serum, ebenso wie foetales Rinderserum, bei -20°C aufbewahrt.

7. Anlegen von Stabilaten

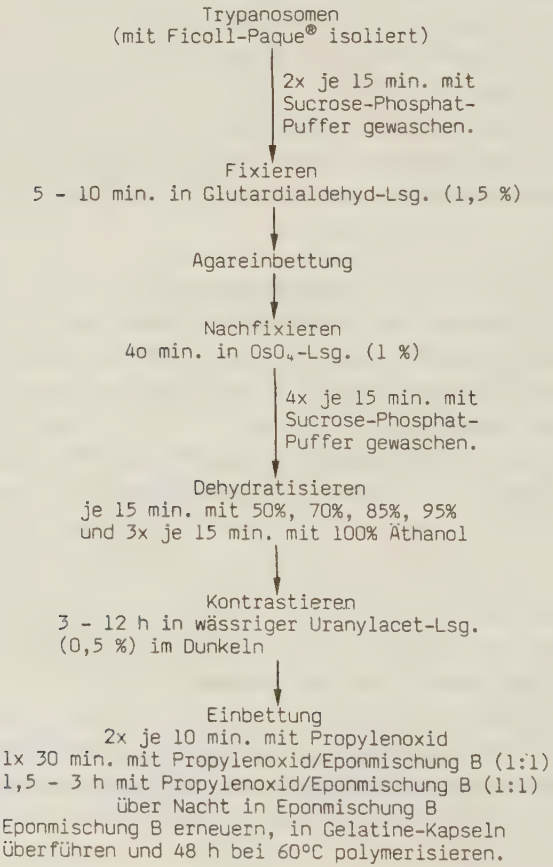
a) Dauerkulturen von Trypanosomen: 2,1 ml eiskalte Einfrierlösung (vergleiche Anhang) und 0,7 ml frisch entnommenes und unbehandeltes Vollblut einer hoch infizierten Maus (> 5 x 10^8 Tryp./ml) wurden sorgfältig gemischt, wobei die Glycerin-Endkonzentration 12 % betrug. Diese Suspension wurde in Mikropipetten mit einem Nennvolumen von 100 µl aufgezogen, dann wurden die Enden der Glaskapillaren über einem Bunsenbrenner zugeschmolzen. Die Kapillaren wurden 30 min. bei +4°C gelagert und anschließend innerhalb von 60 min. im Methanolbad eines Lyophilisators (L-05 von WKF) auf -60°C abgekühlt, wobei die Abkühlungsgeschwindigkeit etwa 1°C/min betrug. Aus dem Methanolbad wurden die Kulturen sofort in flüssigen Stickstoff (-198°C) überführt.

b) Dauerkulturen von Microtus montanus-Zellen: Nach dem Trypsinieren wurden die Fibroblasten im Einfriermedium mit DMSO (vergl. Anhang) aufgenommen und auf eine Zelldichte von etwa 1 x 10^6 Zellen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde in 1 ml Portionen in dicht verschraubbare, sterile Einfriergefäße eingefüllt und ebenfalls zunächst innerhalb von 30 min. auf +4°C und dann im Verlauf von 1 h auf -60°C gebracht. Wie die Trypanosomen wurden die Stabilate in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

8. Präparation von Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Bei der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie wurden verschiedene Techniken ausprobiert, wobei sich folgendes Verfahren am besten bewährt hat. (Vergl. dazu auch 145 und 167.)
Es wurden stets hoch infizierte Mäuse (~1 x 10^9 Tryp./ml) verwendet, wobei einigen Tieren 30 min. vor der Blutentnahme 100 - 200 µg Pentalenolacton intravenös appliziert worden war. Die Blutentnahme sowie die Isolierung der Parasiten mittels Ficoll-Paque® erfolgte auf übliche Wei-

se. Dann wurden die Trypanosomen allerdings nicht in HEPES-Medium, sondern zweimal in Sucrose-Phosphat-Puffer (vergl. Anhang) gewaschen und 5 - 10 min. in Glutardialdehyd-Lösung (1,5 %) fixiert. Anschließend erfolgte eine Agar-Einbettung, wobei einige Tropfen der Trypanosomen-Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und mit heißer Agarlösung (46°C) durchmischt wurden. Nach dem Erkalten wurden mit einem Skalpell kleine Blöckchen mit einer Kantenlänge von etwa 2 - 3 mm herausgeschnitten, die zunächst mit 1 %iger Osmiumtetroxid-Lösung nachfixiert und mit steigenden Äthanolkonzentrationen dehydratisiert wurden. Nach dem Kontrastieren mit wässriger Uranylacetat-Lösung wurden die Proben schließlich in Epon eingebettet (vergl. Schema).



Alle Schritte wurden in Eppendorf-cups durchgeführt, die Einbettung erfolgte in Gelatine-Kapseln, die nach der Polymerisierung in kochendem Wasser wieder abgelöst wurden. Die Proben wurden mit Glasmessern am "Pyramitome" getrimmt und anschließend am Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden nochmals mit Bleicitrat-Lösung kontrastiert und schließlich im EM - 109 der Fa. Zeiss betrachtet bzw. fotografiert.

9. Isolierung der GAP-DH aus Trypanosomen

a) Aufschluß: Der Aufschluß der isolierten Trypanosomen erfolgte mit Triton-x-100 in Kaliumphosphat-Puffer (KPP: 125 mM; pH 6,7 mit: 1% Triton-x-100, 100 mM KCl, 100 mM EDTA, 10 mM Dithiothreitol, 25% Glycerin).

b) Kationenaustausch-Chromatographie: Die Säulendimensionen waren 3 x 20 cm. Es wurde Cellex-CM® verwendet, das in KPP (20 mM, pH 5,7 mit: 15 mM KCl, 5 mM Mercaptoäthanol (2-ME), 5 mM EDTA, 1 mM NAD) äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl-Gradienten von 50 - 300 mM in KPP (50 mM, pH 5,7 mit: 10% Glycerin, 5 mM 2-ME, 5 mM EDTA).

c) Dialyse: Es wurde eine Dialyse gegen 4 l KPP (25 mM, pH 6,9 mit: 25 mM KCl, 5 mM 2-ME, 1 µM NAD) durchgeführt.

d) Hydroxylapatit-Chromatographie: Die Säulendimensionen waren 1 x 10 cm, die Flußgeschwindigkeit betrug 20 ml/h. Es wurde Biogel HTP® verwendet, das im Dialyse-Puffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einem KPP-Gradienten von 25 - 500 mM (pH 6,9 mit: 25 mM KCl, 10 mM 2-ME, 2 µM NAD).

e) Gelfiltrations-Chromatographie: Die Säulendimensionen waren 2 x 150 cm, die Flußgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Es wurde Biogel A 0,5® verwendet, das in KPP (50 mM; ph 6,9 mit: 50 mM KCl, 5 mM 2-ME, 5 mM EDTA, 1 µM NAD) äquilibriert worden war.

10. Elektrophorese-Bedingungen

Es wurde ein übliches diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-Verfahren (Disc-PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) angewendet.

a) Sammelgel (4,5 %ig):

5	ml Lsg. B
1,5	ml Lsg. A
3,5	ml H_2O
100	µl SDS-Lösung (10 %ig)
10	µl TEMED
10	mg $K_2S_2O_8$

b) Trenngel (15 %ig):

7,5	ml Lsg. A
2,5	ml Lsg. C
5,o	ml Lsg. D
150	µl SDS-Lösung (10 %ig)
8	mg $K_2S_2O_8$
3	µl TEMED

c) Lösungen:

Lsg. A: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Lsg. B: Tris/HCl-Puffer 0,25 M, pH 6.8
Lsg. C: Tris/HCl-Puffer 0,75 M, pH 8.8
Lsg. D: 50 % Glycerin in Lsg. C

d) Proteinanfärbung:

nach Weber/Osborn (J. Biol. Chem. 244. 4406 (1969))

Anfärbung:	1,25	g Coomassie-Blue G 250
	46	ml Essigsäure
	227	ml Methanol
	227	ml H_2O
Färbedauer:	30-60	min.
Entfärber:	300	ml Essigsäure
	300	ml Methanol
	3400	ml Aqua dest.

C Ergebnisse

1. Experimenteller Umgang mit Trypanosomen

a) Parasitaemie-Verlauf bei monomorphen und pleomorphen Stämmen: Wie bereits angedeutet wurde, verläuft die Parasitaemie mit monomorphen Stämmen völlig anders als mit pleomorphen. Dieses unterschiedliche Verhalten wird aus den Abbildungen IV.6 und IV.7 deutlich, die die Parasiten-Dichte im Blut bei fortschreitender Trypanosomiasis wiedergeben. Die Infektion der Tiere erfolgte in allen Fällen mit einem Inokulum von etwa 5×10^5 Trypanosomen pro Maus. Abb. IV.6 zeigt den Parasitaemie-Verlauf in drei Tieren, die mit dem monomorphen Stamm H 81 A infiziert worden waren (der ebenfalls monomorphe Stamm STIB 427 verhält sich entsprechend). Man erkennt, daß bereits 24 h nach der Infektion genügend hohe Parasiten-Konzentrationen auftraten, um sie mittels Neubauer-Hämocytometer auszählen zu können ($\geq 1 \times 10^6$ Tryp./ml). Danach verlief die Zunahme der Trypanosomen-Dichte regelmäßig, mit einer Generationszeit von etwa 5 h. Bei einem Tier trat zwar eine etwas verlängerte "lag - Phase" auf, dann erfolgte aber auch hier der Anstieg mit der gleichen Verdoppelungszeit. Gleichzeitig wurden zu allen Zeiten neben den Trypanosomen auch die Erytrocyten und die Lymphocyten gezählt. Dabei ergab sich im Verlauf der Infektion bei beiden Zelltypen keine signifikante Änderung der jeweiligen Zelldichte. Die hier wiedergegebenen Zahlenwerte entsprechen den Mittelwerten mit den zugehörigen Standardabweichungen aus je 24 Meßwerten:

Erythrocyten: $8{,}5 \times 10^9 \pm 1{,}3 \times 10^9$ Erys./ml
Lymphocyten: $9{,}8 \times 10^6 \pm 3{,}5 \times 10^6$ Lymph./ml

Dagegen wurde hier, und vor allem auch bei den Versuchen zur Trypanosomen-Isolierung mittels Ficoll-Paque® deutlich, daß die Infektion von einer drastischen Thrombocytopenie begleitet ist, was bei sehr hoher Parasitaemie auch in einer deutlich verlängerten Blutungszeit -z.B. nach der Blutentnahme zur Bestimmung der Trypanosomen- Konzentration- zum Ausdruck kam.Die infizierten Mäuse zeigten im Verlauf der Trypanosomiasis mit monomorphen Stämmen keinerlei krankhafte Veränderungen . Das Fell war glatt und seidig und die Tiere waren normal aktiv. Bei Parasitaemien zwischen 1×10^9 und 2×10^9 Tryp./ml wurden sie dann plötzlich

lethargisch und gingen schließlich innerhalb von Minuten unter krampfartigen Zuständen ein.
Abbildung IV.7 zeigt exemplarisch den Parasitaemie-Verlauf in einer Maus nach Infektion mit dem pleomorphen Stamm STIB 247. Wie man sieht, erfolgt die Parasitaemie mit unregelmäßiger Periodizität, so daß -im Gegensatz zu den monomorphen Stämmen- keine Generationszeit angegeben werden kann. Es ist somit auch nicht möglich, aus einer experimentell bestimmten Trypanosomen-Dichte im Blut vorauszuberechnen, wann ein angestrebter Infektionsgrad (z.B. 1 x 10^9 Tryp./ml für eine Isolierung) erreicht werden wird. Das macht den experimentellen Umgang mit pleomorphen Stämmen unkalkulierbar und ist der Grund für die bevorzugte Verwendung monomorpher Trypanosomen. In Bezug auf die Empfindlichkeit gegen Pentalenolacton sind allerdings im Laufe dieser Arbeit niemals Unterschiede zwischen Mono- und pleomorphen Trypanosomen aufgetreten.
Im Gegensatz zu den hochvirulenten monomorphen Stämmen (H 81 A, STIB 427), die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen innerhalb von 3 - 5 Tagen zum Tod ihrer Wirte führten (vergl. Abb. IV.6), starben die Mäuse durch pleomorphe Stämme (STIB 366, STIB 247) in der Regel erst 4 - 5 Wochen nach der Infektion. Die Parasitaemie war dabei stets von einer geringen Hämolyse begleitet, auch zeigten die Tiere, vor allem in der zweiten Hälfte der Trypanosomiasen, ein deutlich krankhaftes Verhalten (gesträubtes Fell, Buckel, eingeschränkte Bewegungsaktivität).

b) Isolierung der Trypanosomen mittels Ficoll-Paque®: Ficoll-Paque® ist ein Material, das primär zur Lymphocyten-Präparation entwickelt wurde. Da bekannt ist, daß Trypanosomen wesentlich leichter sind als Erythrocyten, was man ja auch zur Isolierung der Parasiten mittels "Low-speed-Zentrifugation" (vergl. spez. Methoden) ausnutzt, lag die Vermutung nahe, daß sie mit diesem Material (Ficoll 400, Dichte 1.077 g/cm) ebenfalls abgetrennt werden können. Dabei mußte natürlich von vornherein die Kontamination mit Lymphocyten in Kauf genommen werden. Das ist aber bei der "Low-speed-Zentrifugationstechnik" ebenfalls gegeben, und selbst die Isolierung mittels Ionenaustauschern war nie ganz frei von Kontamination mit anderen Blutzellen (auch Erythrocyten). Andererseits versprach diese Methode gute Reproduzierbarkeit, war einfach in der Anwendung und vorallem schnell (was für die Qualität der isolierten Trypanosomen ein entscheidendes Kriterium darstellt) durchzuführen. Darüber hinaus ist

Abb. IV.6: Zunahme der Trypanosomen-Konzentration im Blut bei Verwendung von monomorphen Parasiten. Es ist der Parasitaemieverlauf mit dem Stamm H 81 A in drei Mäusen wiedergegeben.

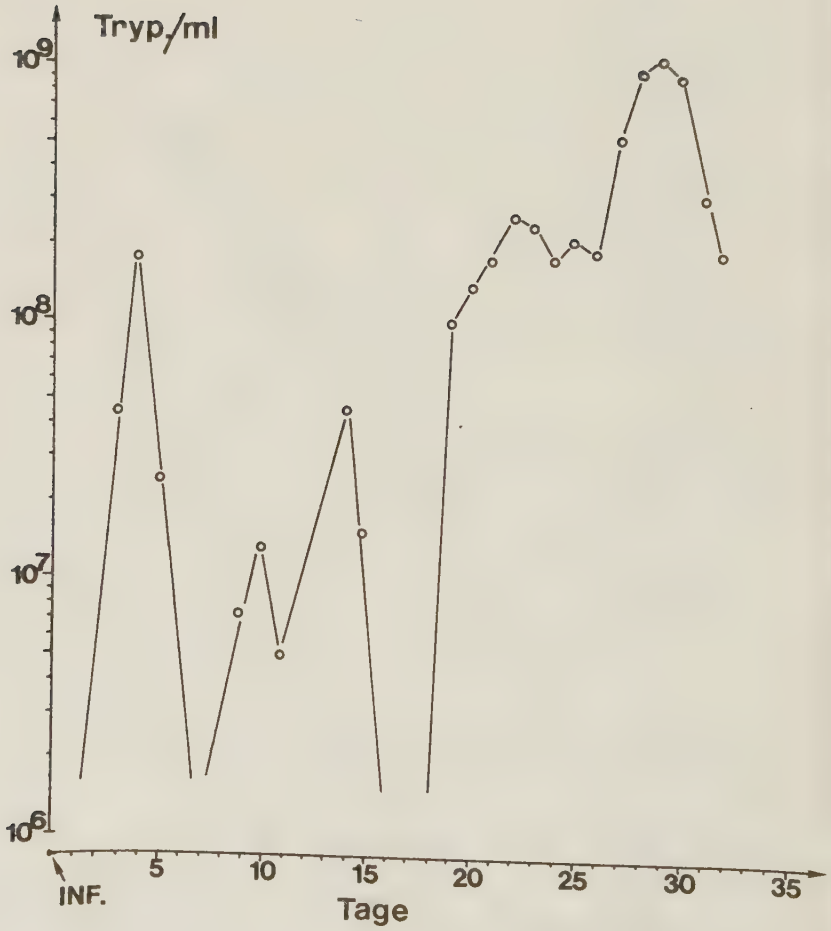


Abb. IV.7: Parasitenverlauf bei Verwendung von pleomorphen Strypanosomen (STIB 247).

das Material steril, isoton, lange Zeit haltbar und enthält zur Stabilisierung der Blutzellen Na-Diatrizoat. Interessant war aus praktischen Erwägungen eigentlich nur die Isolierung der Trypansosomen aus hochinfiziertem Blut heraus, da für die durchgeführten Versuche fast immer eine hohe Parasiten-Ausbeute nötig war. Wie die Tabelle ausweist, ist diese Methode auch nur bei Infektionsraten von > 1 x 10^8 Tryp./ml günstig. Hingegen wird bei geringeren Parasitaemien nicht nur die relative Kontamination erheblich schlechter, da ja der Anteil an Blutzellen in etwa konstant bleibt, während die absolute Trypanosomen-Zahl sinkt, sondern auch die Ausbeute fällt auf Werte von z.T. weit unter 30 % ab. Darüber hinaus finden sich in der Trypanosomen-Fraktion bei geringe Parasitaemie auch Thrombocyten, wobei in 7 Isolierungen aus schwach infiziertem Blut Konzentrationen von 2,4 x 10^8 bis 5,0 x 10^8 Thrombocyten pro Ansatz ausgezählt wurden (die Werte sind nicht in der Tabelle aufgeführt). Bei Infektionsraten von mehr als 5 x 10^8 Tryp./ml in situ tritt jedoch eine ausgeprägte Thrombocytopenie in Erscheinung, so daß die Kontamination mit diesen Blutzellen sehr gering wurde und zumeist nicht mehr ausgezählt werden konnte.

Es sei aber nochmals darauf hingewiesen, daß Isolierungen von Trypanosomen aus gering parasitierten Mäusen im Rahmen dieser Arbeit keine Bedeutung hatten. Sollte dies aus bestimmten Gründen nötig sein, so würde sich eine Kombination mit der Ionenaustausch-Methode anbieten, da man dann mit sehr kleinen Säulenkapazitäten auskäme und die Isolierung relativ schnell durchgeführt werden könnte. Evtl. müßte man dabei vor der Ficoll-Paque®-Isolierung die Sucrose-Citrat-Verdünnung erhöhen, um die Ausbeute zu steigern. Wie aus der Tabelle ebenfalls abgelesen werden kann, beträgt der Anteil an Erythrocyten in der Regel etwa 1,1 x 10^7 Erythrocyten pro Isolierung, außerdem treten pro Ansatz im Mittel etwa 1,2 x 10^7 Lymphocyten auf. Da für die Isolierung von Trypanosomen fast ausschließlich Tiere herangezogen wurden, die eine Parasitaemie von > 1 x 10^9 Tryp./ml aufwiesen, kann man -bei einem Mittelwert von 1,4 ml Blut pro Maus (vergl. Tabelle)- davon ausgehen, daß die insgesamt vorhandene Kontamination der Trypanosomen-Suspension mit anderen Blutzellen etwa 2 % betrug, und somit für die Metabolit-Bestimmungen und die Enzymmessungen ohne Belang war.

Lfd. Nr.	Infektion in situ [Tryp./ml]	Trypanosomen im SC-Blut [Tryp./ml]	Blutanteil in 4 ml SC-Blut	Isolierte Trypanosomen [Tryp./4 ml]	Ausbeute [%]	Erythrocyten-Kontamination [Ery./ml]	[%]	Lymphocyten-Kontamination [Lym./ml]	[%]
1	$1,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	1,6 ml	$7,3 \times 10^5$	4,6	nicht bestimmt		nicht bestimmt	
2	$1,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	0,4 ml	$2,5 \times 10^5$	6,3	"	"	"	"
3	$1,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	1,9 ml	$8,2 \times 10^6$	29,3	"	"	"	"
4	$2,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	0,9 ml	$4,0 \times 10^6$	20,0	"	"	"	"
5	$2,2 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	1,7 ml	$3,3 \times 10^8$	89,2	6×10^6	1,8	1×10^7	3,9
6	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	1,0 ml	$2,3 \times 10^8$	104,5	1×10^7	5,2	1×10^7	5,2
7	$2,2 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	1,7 ml	$3,3 \times 10^8$	89,2	1×10^7	3,6	1×10^7	3,9
8	$2,5 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	1,7 ml	$3,3 \times 10^8$	78,6	nicht bestimmt		nicht bestimmt	
9	$3,9 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	1,4 ml	$4,2 \times 10^8$	76,4	3×10^6	0,7	1×10^7	2,9
10	$2,6 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	1,7 ml	$4,6 \times 10^8$	104,6	1×10^7	2,2	1×10^7	3,0
11	$9,1 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$	1,0 ml	$9,0 \times 10^8$	102,3	2×10^7	1,7	2×10^7	1,7
12	$1,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	1,4 ml	$1,4 \times 10^9$	100,0	2×10^7	1,4	5×10^6	0,6
13	$1,2 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	1,2 ml	$1,5 \times 10^9$	107,0	5×10^6	1,7	5×10^6	1,7
14	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	1,1 ml	$1,9 \times 10^9$	89,0	1×10^7	2,6	5×10^6	1,3
15	$1,5 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	1,2 ml	$1,9 \times 10^9$	95,0	5×10^6	1,4	1×10^7	2,7

Tab.IV.1: Ausbeute und Kontamination bei der Isolierung von Trypanosomen mittels Ficoll Paque®.

2. Erste Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf isolierte Trypanosomen

Um zu ermitteln, in wieweit auch Trypanosomen für Pl empfindlich sind, wurden zunächst Suspensionen mit isolierten Parasiten verwendet. Dabei wurde sehr schnell deutlich, daß Trypanosomen unter diesen Bedingungen ebenfalls rasch auf Pl-Belastung reagieren. Sie verhalten sich dabei so, als ob sie ohne Substrat inkubiert würden, werden innerhalb weniger Minuten unbeweglich und gehen zugrunde. Im Phasenkontrast-Mikroskop erscheinen die Flagellaten dann blaß und Beugungsäume an den Zellgrenzen -die an lebenden, beweglichen Trypanosomen stark ausgeprägt sind- sind nicht mehr erkennbar. Die Zellkörper scheinen dabei zu quellen und man erkennt im Cytoplasma reichlich Zelleinschlüsse und Organellen, die zitternde Bewegungen ausführen. Die endgültige Lyse der Zellen erfolgt in der Regel innerhalb der nächsten 20 - 30 Minuten.

Für den hier wiedergegebenen Versuch wurden 2 Mäuse verwendet, die mit dem monomorphen Stamm H 81 A infiziert worden waren. Die Isolierung erfolgte mittels Ficoll-Paque®. Anschließend wurden die isolierten Trypanosomen zunächst vereinigt, um eine einheitliche Parasitenpopulation zu gewährleisten, und dann in zwei Portionen aufgeteilt. Beide Ansätze wurden zentrifugiert, einmal in glucosefreiem HEPES-Medium gewaschen und schließlich in je 5 ml HEPES-Medium aufgenommen, wobei ein Ansatz Glucose (20 mM) und der andere Glycerin (20 mM) als C-Quelle enthielt. Da bekannt ist, daß Trypanosomen auch Glycerin als Substrat akzeptieren, wurde es hier ebenfalls eingesetzt, um die Pl-Wirkung auch unter diesen Bedingungen zu testen. Um Störungen durch eingeschleppte Glucose zu vermeiden, mußte die Suspension zunächst glucosefrei gewaschen werden. Dieser Schritt ist sehr heikel und muß möglichst schnell durchgeführt werden, da die Trypanosomen sonst sofort zugrunde gehen. Der Waschüberstand wurde dabei mit Glucose-Teststreifen (Glucoquant®) getestet, der stets negativ reagierte. Die Trypanosomen-Dichte war in beiden Ansätzen annähernd identisch:

HEPES-Medium mit Glucose : $1{,}9 \times 10^8$ Tryp./ml
HEPES-Medium mit Glycerin: $2{,}0 \times 10^8$ Tryp./ml.

Es wurden jeweils 3 x 1,5 ml Portionen in Erlenmeyer-Kölbchen (25 ml) überführt, wobei zu je 2 Kölbchen Pentalenolacton (2,3 µg/ml bzw.

11,7 µg/ml) supplementiert wurde. Die restlichen 500 µl jeden Ansatzes wurden für die Null-Wert-Bestimmung herangezogen. Wie die Abb. IV.8 a-c zeigen, findet durch Pentalenolacton-Einfluß bei beiden Substraten eine rasche Hemmung der Pyruvat-Bildung statt. Im mikroskopischen Bild findet man in den Kontrollen nach 60 min. eine Abnahme an beweglichen Trypanosomen um maximal 10 - 20 %, während in den Ansätzen mit der hohen Pl-Dosis bereits nach 10 min., mit 2,3 µg Pl/ml nach 20 min., allenfalls vereinzelt lebende Trypanosomen auftraten. Wie die Abb. IV.8 c zeigt, wird ein Teil der Glucose auch unter aeroben Bedingungen in Glycerin überführt, wobei der Glycerin-Anteil etwa 11 % der Pyruvat-Menge ausmacht. Eine Alternative zur Pyruvat-Bildung stellt dieser Glycerin-Weg allerdings nicht dar, obwohl der Pl-Block erst hinter der Aldolase- bzw. Triosephosphat-Isomerase-Reaktion liegt und die Glycerin-Bildung somit nicht behindert ist. Pro Mol Glucose könnten jedoch (auch wenn die Glycerin-Kinase-Stufe bei Trypanosomen ATP liefert) nur maximal 2 Mol ATP geliefert werden. Die Reaktionsfolge Glucose ► Glycerin würde also einen "futile cycle" darstellen und ist für die Energiegewinnung darum indiskutabel (vergl Abb. IV.5). Darüber hinaus käme es unter diesen Bedingungen zu einer Verarmung an NADH, da die GAP-DH - Reaktion fehlt.

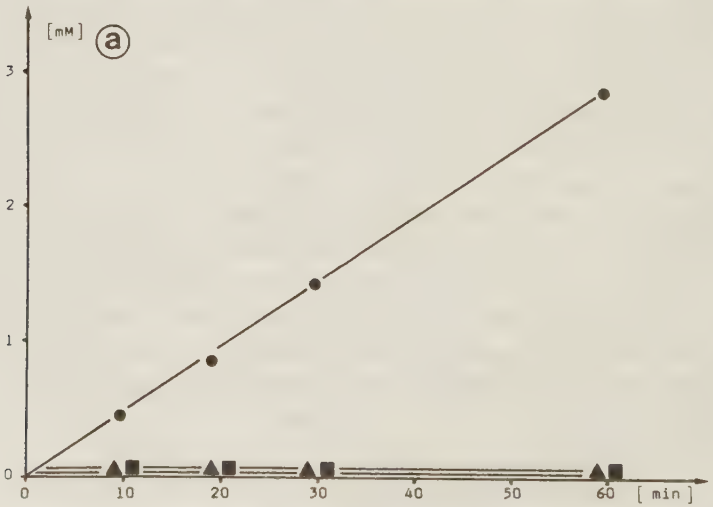


Abb. IV.8a: Pyruvat-Bestimmung (C-Quelle: Glycerin). (●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 2,3 µg Pl/ml, (■) = 11,7 µg Pl/ml.

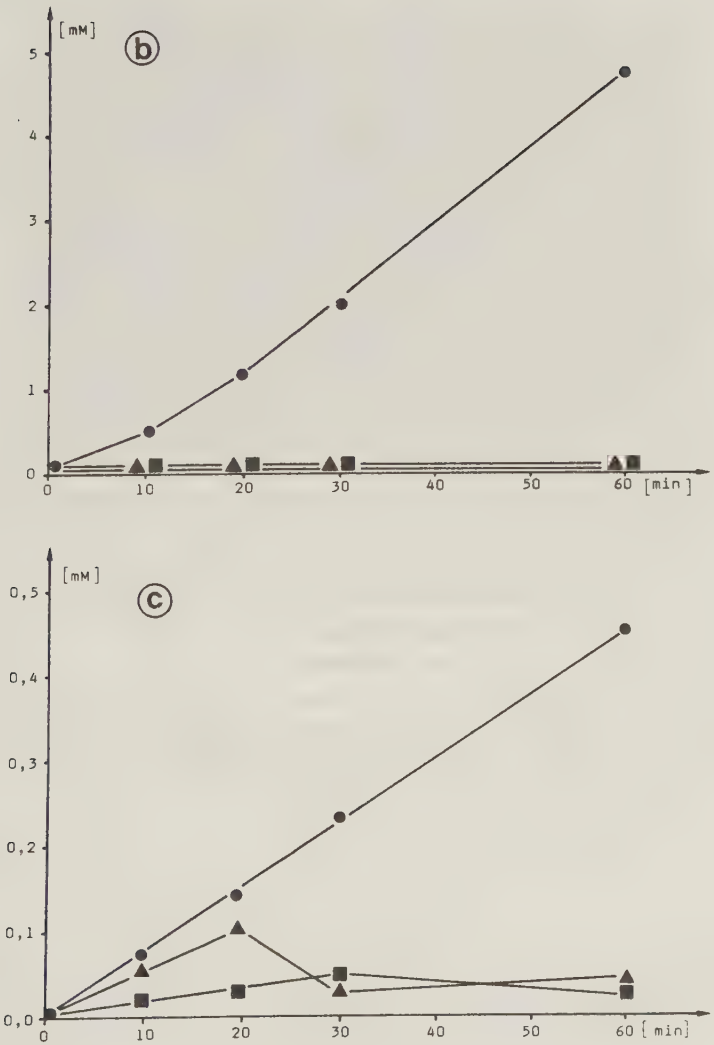


Abb. IV.8b: Pyruvat-Bestimmung (C-Quelle: Glucose)
IV.8c: Glycerin-Bestimmung (C-Quelle: Glucose)
(●)= Kontrolle ohne pl, (▲)= 2,3 µg Pl/ml, (■)= 11,7 µg Pl/ml

3. Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Trypanosomen unter in situ - Bedingungen

Nach dem sich die ausgeprägte Empfindlichkeit der Trypanosomen gegenüber Pentalenolacton in den Suspensionen gezeigt hatte, sollte nun auch versucht werden, die Parasiten unter in situ - Bedingungen abzutöten. Dazu wurde infizierten Mäusen Pentalenolacton appliziert, und nach verschiedenen Zeiten (von unmittelbar nach der Pl-Gabe bis zu mehreren Tagen danach) Blutproben dieser Tiere unter dem Mikroskop kontrolliert. In keinem Fall war jedoch eine signifikante Zunahme an toten Parasiten festzustellen und die Mäuse starben in der Regel zur gleichen Zeit wie die nicht Pl-behandelten Kontrollen. Dabei war es völlig gleichgültig, in welchem Stadium der Parasitaemie Pl gegeben wurde, und ebenso, wie hoch die verabreichte Dosis war (in hoch infizierten Tieren wurde sogar bis zu 500 µg Pl -entspricht einer fünffachen Letaldosis- gegeben, ohne daß ein signifikanter Effekt bei den Trypanosomen aufgetreten wäre). Auch verschiedene Applikationsformen wurden verwendet, nämlich intraperitoneal, intravenös, subcutan und per oral (im Trinkwasser), alle jedoch mit dem gleichen negativen Ergebnis. Wie das folgende Beispiel zeigt, war durch Pl nicht einmal eine vorübergehende Verlangsamung der Generationszeit von 5 h (vergl. Abb. IV 7a) zu erreichen:

Tryp./ml vor Pl-Zugabe	Pl-Dosis (i.v. appl.)	Tryp./ml 5 h nach Pl-Gabe	Zunahme der Zelldichte um Faktor
$4{,}0 \times 10^8$	50 µg Pl	$7{,}7 \times 10^8$	1,93
$2{,}7 \times 10^8$	50 µg Pl	$5{,}1 \times 10^8$	1,89

Der aus den in situ - Versuchen bekannte Pl-Effekt auf die Erythrocyten (Kap. II) war jedoch wie üblich ausgeprägt. So sieht man im mikroskopischen Präparat ab etwa 2 h nach Pl-Gabe, daß ein sehr großer Teil der Erythrocyten bereits sichtbar geschädigt ist und in charakteristischer "Stechapfelform" vorliegt, während die Trypanosomen offenkundig völlig unbeschadet sind und ihre Bewegungsaktivität nicht eingeschränkt haben (vergl. Abb. IV.9). Die im Blut erreichte aktuelle Pl-Konzentration ist also zumindest hoch genug, um die Erythrocyten irreversibel zu schädigen.

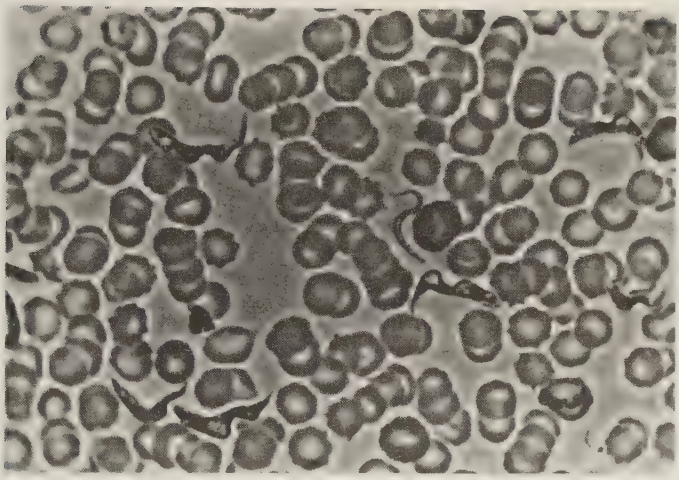


Abb. IV.9: nach Giemsa gefärbter Ausstrich von infiziertem Blut 2 h nach Pl-Gabe (~50 µg/Tier). Während beinahe alle Erythrocyten "Stechapfel-Form" aufweisen, sind die Trypanosomen morphologisch unverändert und unter nativen Bedingungen voll bewegungsfähig. Endvergrößerung: 1200 : 1.

Um zu klären, warum Pentalenolacton unter in situ - Bedingungen keinen Einfluß auf die Trypanosomen ausübt, kamen verschiedene Arbeitshypothesen in Betracht, die experimentell geprüft werden sollten:

a) Trypanosomen sind für Pentalenolacton weit weniger empfindlich als Erythrocyten, so daß die im Blut erreichten aktuellen Konzentrationen für eine Hemmung der Parasiten nicht ausreichen.

b) Trypanosomen aktivieren in situ unter Pl-Einfluß ihre Mitochondrien bzw. die Atmungsketten-Enzyme.

c) Trypanosomen kompensieren die GAP-DH - Hemmung durch Enzym-Neusynthese bzw. durch die Aktivierung eines inaktiven Enzym-Pools oder besitzen unter diesen Bedingungen eine nicht Pl-sensitive GAP-DH.

d) Trypanosomen besitzen einen weiteren, bisher nicht bekannten Weg zur Energiegewinnung.

e) Trypanosomen nehmen Pentalenolacton unter in situ - Bedingungen nicht, bzw. verzögert auf.

a) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Erythrocyten und Trypanosomen: Um die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK´s) für beide Zelltypen zu ermitteln, wurden zwei Versuchsanätze durchgeführt, wobei die Pl-Wirkung sowohl auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, als auch auf den Glykolyse-Durchsatz bestimmt werden sollte. Da das Endprodukt der Glykolyse für Erythrocyten Lactat, für Trypanosomen aber Pyruvat darstellt, wurde versucht, die Umsatzrate beider Zellsysteme getrennt im selben Testansatz zu messen, um die in situ - Bedingungen möglichst optimal zu simulieren. Dazu mußte aber zuvor geklärt werden, ob nicht eine gegenseitige Beeinflussung das Ergebnis verfälscht. In Vorversuchen wurden darum folgende Parameter getestet:

1. In Erythrocyten-Suspensionen tritt unter den üblichen Bedingungen eine zu allen Zeiten konstante Pyruvat-Konzentration von 0,23 ± 0,03 mM auf, wobei die Anzahl der Meßwerte n = 11 betrug, die Inkubationsdauer war 60 min.
2. Setzt man einer solchen Erythrocyten-Suspension externes Pyruvat zu (im Testansatz 3 mM), so bleibt diese Pyruvat-Konzentration im Verlauf der Inkubation konstant (Versuchsergebnis: 3,16 ± 0,18 mM; n = 18),und es wird nur soviel Lactat gebildet, wie in Ansätzen ohne extern zugefüttertes Pyruvat.
3. In Suspensionen von Trypanosomen wird kein Lactat gebildet (0,05 ± 0,05 mM; n = 5) und extern zugefügtes Lactat (im Testansatz 2,5 mM) wird nicht umgesetzt (2,54 ± 0,08 mM; n = 5).

Da somit keine gegenseitige Störung zu erwarten war, wurde das SC-Blut zweier hoch infizierter Mäuse vereinigt und zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit HEPES-Medium mit Glucose (20 mM) gewaschen und anschließend im gleichen Medium aufgenommen, wobei die Zelldichten $1{,}2 \times 10^9$ Erythrocyten/ml bzw. $1{,}0 \times 10^8$ Trypanosomen/ml betrugen. Die Suspension wurde in 2 ml Portionen in 25 ml Erlenmeyer-Kölbchen überführt und bei 37°C und 65 Upm inkubiert. Die eingesetzten Pl-Konzentrationen waren: 2,5 µg/ml und 10 µg/ml. Wie man aus den Diagrammen (Abb. IV.10 a-c) erkennt, erfolgt mit gleichen Pl-Konzentrationen bei beiden Zelltypen ein ähnlicher Hemmeffekt, auch wenn die Erythrocyten geringfügig sensibler zu sein scheinen (vergl. die Kurven mit 1 µg Pl/ml). Das Verhältnis von Erythrocyten zu Trypanosomen betrug etwa 10 : 1 und entsprach somit der Situation in einer infizierten Maus. Um die Pl-Wir-

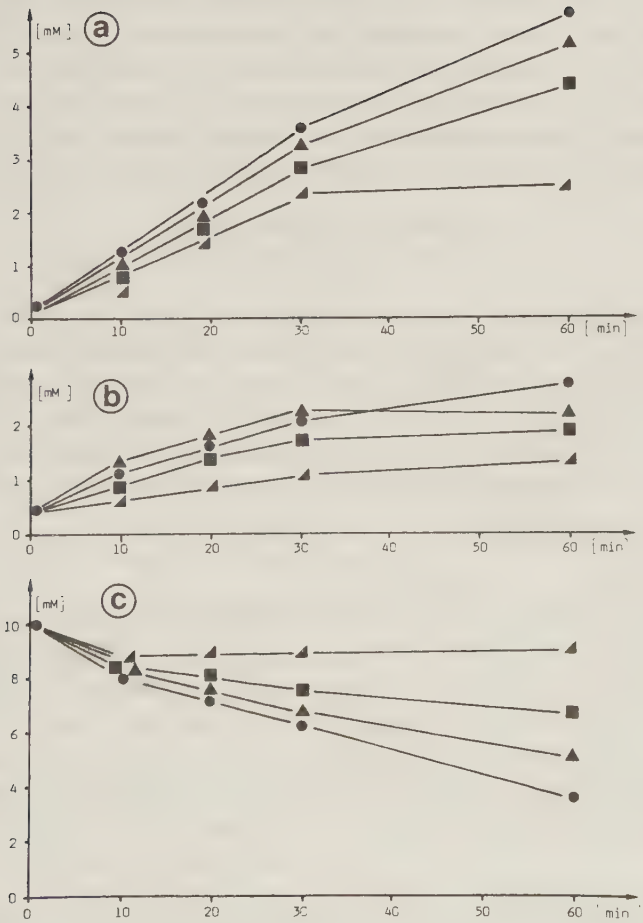


Abb. IV.10: Bestimmung der Pentalenolacton-Wirkung auf Erythrocyten und Trypanosomen im selben Testansatz. (●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,0 µg Pl/ml, (■) = 2,5 µg Pl/ml, (◢) = 10 µg Pl/ml.
a) Pyruvat-Bestimmung b) Lactat-Bestimmung
c) Glucose-Bestimmung.

kung auf die Erythrocyten- und die Trypanosomen-GAP-DH zu messen, konnte natürlich nicht im gleichen Testsystem gearbeitet werden, da die beiden Enzyme nicht ohne weiteres unterscheidbar sind. Es wurden darum Erythrocyten aus einer gesunden, und Trypanosomen aus einer hoch infizierten Maus auf die übliche Weise isoliert, je zweimal mit HEPES-Medium mit Glucose (20 mM) gewaschen und schließlich im gleichen Medium resuspendiert. Die Kulturgefäße wurden wie oben angegeben beschickt und inkubiert. Die Zellkonzentrationen betrugen in diesem Versuch:

$7{,}9 \times 10^8$ Erythrocyten/ml bzw.
$8{,}0 \times 10^7$ Trypanosomen/ml.

und die eingesetzten Pl-Konzentrationen waren 1,5 µg/ml, 6 µg/ml und 15 µg/ml. Wie die Abb. IV.11 a und b zeigen, beträgt die minimale Hemmkonzentration für Erythrocyten etwa 1,5 µg Pl/ml, während sie für Trypanosomen zwischen 1,5 µg/ml und 6 µg/ml liegt. Daß die MHK für Erythrocyten tatsächlich bei etwa 1 µg/ml liegt, wurde durch weitere, hier nicht aufgeführte Versuche, aber auch durch die Abb. IV.10b gestützt.

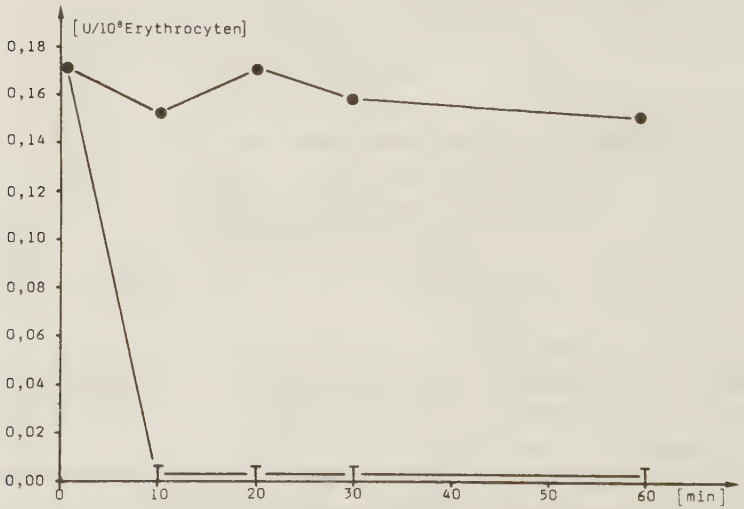


Abb. IV.11 a: Bestimmung der GAP-DH - Aktivität in Erythrocyten-Suspensionen. (●)= Kontrolle; bei allen eingesetzten Pl-Konzentrationen -1,5 µg/ml, 6µg/ml und 15 µg/ml- war keine GAP-DH - Aktivität mehr meßbar (I).

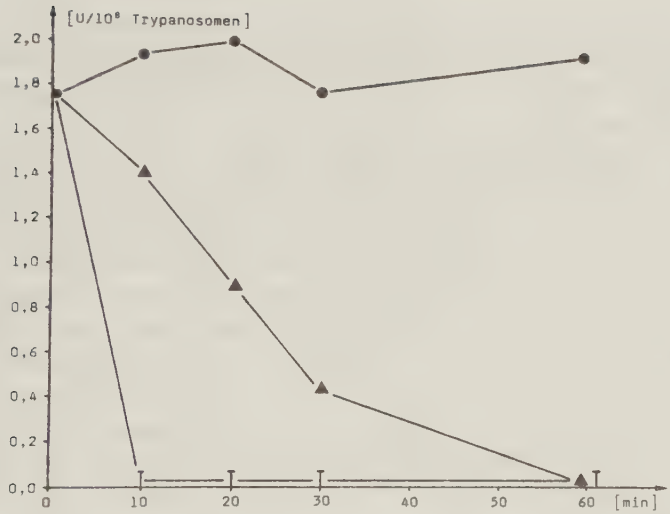


Abb. IV.11 b: Bestimmung der GAP-DH - Aktivität in Trypanosomen-Suspensionen. (●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,5 µg Pl/ml, bei den Pl-Konzentrationen 6 µg/ml und 15 µg/ml war keine GAP-DH - Aktivität mehr meßbar (I).

Wie aus dem hier darstellten Versuch ebenfalls hervorgeht, ist die GAP-DH - Konzentration in Trypanosomen etwa 10 mal höher als in Erythrocyten. Man erkennt aus Experimenten, daß die minimale Hemmkonzentration für Erythrocyten und Trypanosomen unter Bedingungen, die den in situ - Verhältnissen entsprechen, nur geringfügig verschieden sind. Die hier aufgetretene Differenz in der Empfindlichkeit gegen Pentalenolacton ist für beide Zelltypen so minimal, daß sie das völlig unterschiedliche Verhalten in situ nicht erklären kann.

b) Versuche zum Nachweis mitochondrieller Atmung in Blutformen bei Pl-Belastung in situ: Die Möglichkeit, daß Trypanosomen unter in situ - Bedingungen bei Pl-Belastung ihre Atmungsketten-Enzyme aktivieren könnten, erschien von vornherien ausgesprochen unwahrscheinlich, da die Flagellaten in Suspensionen durch Pl-Einfluß innerhalb weniger Minuten bewegungsinaktiv wurden und zugrunde gingen. Eine entsprechende intrazelluläre Umstellung hätte also auch in situ entsprechend schnell greifen müssen, um wirkungsvoll zu sein. Zudem wäre eine solche Umformung wohl

zusätzlich von morphologischen Veränderungen (long slender → short stumpy) begleitet gewesen, wofür aber lichtmikroskopisch keine Evidenzen vorlagen. Dennoch wurden zwei Experimente durchgeführt, um diese Möglichkeit abzuklären.

Zum einen wurden Trypanosomen aus Mäusen, die 30 min. vor der Blutentnahme Pl-Dosen von 100 - 200 µg erhalten hatten, für das Elektronenmikroskop präpariert. Bei der anschließenden Durchmusterung der Präparate zeigten sich im Vergleich mit nicht Pl-behandelten Trypanosomen niemals strukturelle Veränderungen. Insbesondere traten hier nie ausgeprägte Mitochondrien auf, und "cristae"- Einstülpungen waren ebenso selten vorhanden wie in den üblichen Blutformen (Abb. IV.2 und IV.3).

In anderen Versuchen wurde eine Technik von Vickerman zur Sichtbarmachung der Elektronentransport-Kette in Trypanosomen angewendet, die auf der Oxidation von Nitroblau-Tetrazoliumsalz durch NAD beruht. Dem Testansatz wird dabei $NADH_2$ zugesetzt, das seinerseits zunächst erst über die Atmungskette oxidiert werden muß. Die Durchführung des Experimentes erfolgte nach M. Tanner (14). Dazu wurden luftgetrocknete Deckglas-Ausstriche von infiziertem Blut zu verschiedenen Zeiten nach Pl-Applikation in situ angefertigt. Diese Ausstriche wurden 5 min. bei +4°C mit Glutardialdehyd-Lösung (5 %ig in 0,1 M Cacodylat-Puffer, pH 7.2) fixiert und anschließend mehrfach mit Cacodylat-Puffer gewaschen. Die Präparate wurden 1 h bei 37°C in 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7.2 mit $NADH_2$ (1,33 mg/ml) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (0,33 mg/ml) inkubiert. Formazan-Niederschläge, wie sie in procyclischen Trypanosomen auftreten, konnten dabei niemals beobachtet werden.

Wie diese Ergebnisse belegen, stellt die mitochondriale Atmung für Blutform-Trypanosomen auch unter Pl-Belastung keine Alternative zur Energiegewinnung via Glykolyse dar.

c) Können Trypanosomen die GAP-DH - Hemmung durch eine rasche Enzym-Neusynthese bzw. durch Aktivierung eines inaktiven Enzym-Pools kompensieren oder besitzen sie ein nicht Pl-sensitives Enzym? Den Anstoß zu diesen Untersuchungen hatten Beobachtungen an Trypanosomen-Suspensionen gegeben, bei denen die Parasiten während der Isolierung mit glucosefreiem Medium gewaschen worden waren und dann in glucosehaltigem Medium inkubiert wurden. In diesen Suspensionen war die GAP-DH - Aktivität zum

Zeitpunkt 0 min. immer ausgesprochen gering und erreichte erst etwa 10 min. nach Inkubationsbeginn einen konstanten Level, sofern die dabei eingesetzte Glucose-Konzentration nicht zu gering war. Ein solcher Versuch ist in Abb. IV.12a und b wiedergegeben. Es wurden dazu Trypanosomen aus zwei hoch infizierten Mäusen isoliert und mit glucosefreiem HEPES-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Trypanosomen in ebenfalls glucosefreiem HEPES-Medium aufgenommen und auf sechs Inkubationsgefäße zu je 1,5 ml Portionen verteilt; die Zelldichte betrug dabei 6,7 x 10^7 Tryp./ml. Zu diesen Ansätzen wurden aus einer 1 M Glucose-Stammlösung zu je 2 Kolben Glucose in einer Endkonzentration von 0,7 mM, 3,3 mM und 33,3 mM supplementiert, dann wurden die Suspensionen wie üblich inkubiert; Pentalenolacton wurde bei diesem Versuch nicht eingesetzt. Man erkennt, daß zum Zeitpunkt 0 min. ein ausgesprochen niedriger GAP-DH - Wert vorliegt. Bei ausreichender Glucose-Versorgung steigt die Aktivität dann aber innerhalb von 10 min. auf einen konstanten Level an (1,25 ± 0,16 U/10^8 Trypanosomen). Bei sehr geringer Glucose-Konzentration

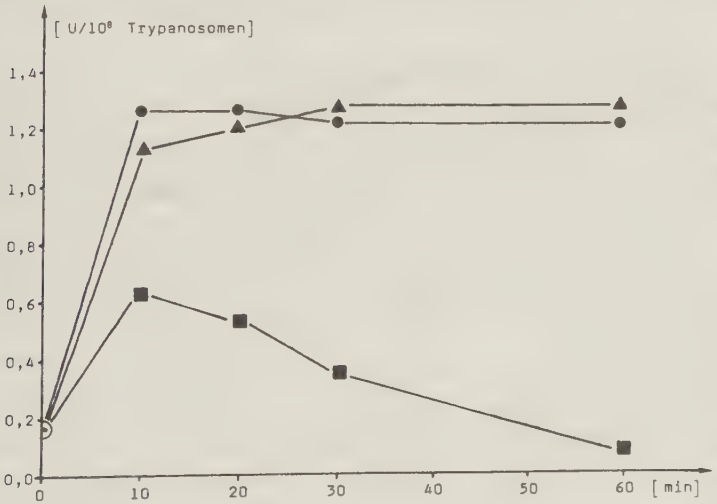


Abb. IV.12a: GAP-DH - Bestimmung in Trypanosomen-Suspensionen bei Inkubation mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen nach kurzzeitiger Exponierung der Zellen in glucosefreiem Medium. (●)=33,3 mM Glucose, (▲)=3,3 mM Glucose, (■)=0,7 mM Glucose

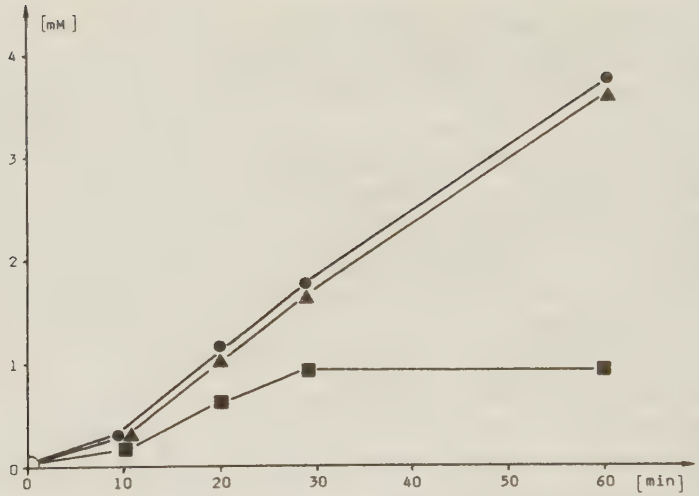


Abb. IV.12 b: Pyruvat-Bestimmung in Trypanosomen-Suspensionen nach kurzzeitiger Exponierung der Zellen in glucosefreiem Medium. (●)=33,3 mM Glucose, (▲)=3,3 mM Glucose, (■)=0,7 mM Glucose.

im Medium (0,7M) kann dieser Wert jedoch nicht erreicht werden, obwohl auch in diesen Suspensionen -ebenso wie in jenen mit höherer Glucose-Konzentration- nach 30 min. noch mehr als 80 % der Trypanosomen bewegungsaktiv waren. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ist in Suspensionen aus Trypanosomen, die mit glucosehaltigem Medium isoliert wurden, die GAP-DH - Aktivität bereits zum Zeitpunkt 0 min. normal hoch (vergl. Abb. IV.11 b). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die GAP-DH - Aktivität in Trypanosomen z.B. in Abhängigkeit vom Substrat-Angebot rasch reguliert werden kann.

Zur weiteren Abklärung wurden Experimente mit radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführt, die zeigen sollten, ob unter in situ - Bedingungen in Gegenwart von Pl eine verstärkte GAP-DH - Neusynthese einsetzt, um eine Pl-Schädigung zu kompensieren. Es wurden dazu drei hoch infizierte Tiere verwendet, die während 2 h mit ^{14}C-Glycin und Pentalenolacton bzw. nur mit ^{14}C-Glycin inkubiert wurden; die Lösungen wurden i.p. gespritzt:

Infektion in situ	^{14}C-Glycin	Pl-Menge
7,1 x 10^8 Tryp./ml	5 µCi/Tier	150 µg/Tier
1,3 x 10^8 Tryp./ml	5 µCi/Tier	150 µg/Tier
1,3 x 10^8 Tryp./ml	5 µCi/Tier	---

Anschließend wurden die Trypanosomen wie üblich mittels Ficoll-Paque® isoliert. Die Parasiten wurden jeweils in 50 mM Tris-Puffer (pH 7.4 mit 2 % SDS und 5 mM Mercaptoäthanol) aufgenommen, wobei die Zelldichten zwischen 5 x 10^8 und 8 x 10^8 Tryp./ml lagen. Diese Suspensionen wurden beschallt (Sonifier B 12, 10 sec., Stufe 3) und je 2 min. im Wasserbad gekocht. Dann wurden die Proben so auf ein SDS-Gel aufgetragen, daß zwei identisch beschichtete Hälften vorlagen. Nach der Durchführung der Elektrophorese (Disc-E´phorese) wurde eine Hälfte des Gels mit Coomassie-Blue angefärbt (im Abschnitt über die GAP-DH - Isolierung ist ein charakteristisches Bandenmuster wiedergegeben, Abb. IV.21). Schließlich wurde das Gel für eine Autoradiographie herangezogen (Exponierungszeit: ~3 Mon.). Der andere Teil des Gels wurde entsprechend der Probenauftragung vertikal in drei Teile zerschnitten, die dann einzeln horizontal in 1 mm breite Streifen unterteilt wurden. Dazu wurden zwei gleichgroße Glasplatten (10 cm x 10 cm) an den Rändern mit Klebestreifen zusammengeklebt, wobei zuvor ein gleichgroßes Blatt Millimeterpapier zwischen die Glasplatten eingelegt worden war. Die Gelstreifen konnten nun auf der oberen Glasplatte ausgerichtet und mittels einer Klinge in millimeterbreiten Abständen zerschnitten werden. Jeder Gelstreifen wurde in Szintillationsgläschen überführt und zunächst über Nacht mit 100 µl H_2O_2 (30 %) bei 50°C inkubiert. Am nächsten Morgen, nachdem das Gel sich aufgelöst hatte, wurden jeweils 5 ml Szintillator-Cocktail zugesetzt und die Proben im Liquid Szintillatons Counter (LSC) ausgezählt. Geringe, aber meßbare Radioaktivität trat im Gel dabei nur in einem Bereich von etwa 0,5 cm bis 1,5 cm auf, und zwar sowohl mit als auch ohne Pentalenolacton. In dem Abschnitt, in dem die GAP-DH auftritt (2,9 cm, vergl. Enzymisolierung: Abb. IV.21), war jedoch keine signifikante Zunahme an Radioaktivität unter Pl-Belastung zu verzeichnen. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei der Autoradiographie erhalten.

Es ergaben sich somit keinerlei Hinweise dafür, daß Trypanosomen unter in situ - Bedingungen die Pentalenolacton-Wirkung durch gesteigerte

GAP-DH - Neusynthese unterlaufen können.
Außerdem wurde auch gemessen, ob Trypanosomen unter in situ - Bedingungen eine Pl-insensitive GAP-DH bzw. ein NADP-abhängiges Enzym besitzen. In allen untersuchten Fällen war jedoch die GAP-DH aus Trypanosomen, die in situ mit Pl behandelt worden waren, ebenso Pl-sensitiv wie die aus nichtbehandelten Trypanosomen. Darüber hinaus zeigte sich, daß NADP NAD nicht ersetzen kann. (Vergl. auch: Enzymisolierung.)

d) Besitzen Trypanosomen neben der Glykolyse einen weiteren, bisher nicht bekannten Stoffwechselweg zur Energiegewinnung? Es ist bekannt, und auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit eindeutig ersichtlich, daß Trypanosomen in ausgeprägtem Maße die Glykolyse betreiben. Und wie man seit der Entdeckung der Glycosomen durch F. Opperdoes (1977) weiß, haben die Parasiten mit den genannten Organellen sogar ein spezielles System entwickelt, um diesen Stoffwechselweg möglichst effizient ausnutzen zu können. Da zudem sicher geklärt ist, daß eine konventionelle mitochondriale Atmungskette nicht existiert, wird allgemein die Glykolyse als die einzige ATP-liefernde Reaktionsfolge in den Blutformen angenommen. Dennoch ist in der Literatur immer wieder über zusätzliche energieliefernde Prozesse spekuliert worden, insbesondere im Zusammenhang mit den Verhältnissen unter anaeroben Bedingungen bzw. bei Anwendung von Salicylhydroxamsäure (SHAM) als Hemmstoff der Glycerin-3-Phosphat Oxidase (vergl. z.B. 127). Erst kürzlich wurde eine solche Möglichkeit wiederum diskutiert (131, 164), um die erstaunlich hohen intrazellulären Carnitin- bzw. Carnitin-Acyltransferase-Konzentrationen in Trypanosomen zu erklären. Tatsächlich ist dieses Phänomen überraschend, da die ß-Oxidation der Fettsäuren hier offenbar nicht existiert (113).
Auch im Fall von Pentalenolacton würde eine nichtglykolytische ATP-Bildungsreaktion die Unempfindlichkeit der Trypanosomen unter in situ - Bedingungen hinreichend erklären; die Hemmung in Suspension wäre dann einfach durch ein fehlendes Substrat bedingt. Es wurden zur Klärung dieser Möglichkeit verschiedene Medien eingesetzt, wobei aufgrund der jeweils komplexen Zusammensetzung (vergl. Anhang) vermutlich ein geeignetes Sustrat zur Anwendung gelangt wäre. Zusäztlich wurden Threonin und L-Carnitin entsprechend den Angaben von Gilbert und Klein (131) eingesetzt

und darüber hinaus auch Glutamin, Thiamin, Rinderserumalbumin (RSA) und Oleat verwendet. Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tab. IV.2. Man ersieht daraus, daß es in keinem Medium möglich war, die Inaktivierung der Trypanosomen durch Pentalenolacton zu verhindern. Auch gingen die Parasiten ohne Glucose -unabhängig vom Medium- regelmäßig rasch zugrunde. Allerdings zeigten sich signifikante Differenzen zwischen HEPES- und Cross & Mannings-Medium einerseits sowie W/AB 77 und Kultivierungsmedium (für Trypanosomen) andererseits. So waren in den letztgenannten Medien stets geringfügig höhere Pl-Dosen zur Hemmung notwendig und außerdem setzte die Inaktivierung der Parasiten erst nach einer etwas längeren Zeit ein (s. Tabelle). Doch diese Differenzen können auf den Serumanteil in beiden Medien zurückgeführt werden (vergl. 10). Bei all diesen Versuchen wurden in der Regel Suspensionen in HEPES-Medium parallel zu den anderen Medien gemessen, so daß die Ergebnisse auf dieses System normiert werden konnten. Nach der Isolierung der Trypanosomen wurden diese darum zunächst vereinigt, in HEPES-Medium (mit Glucose) gewaschen und dann in den entsprechenden Medien aufgenommen. Der genaue Verlauf solcher Versuche ist in der Abb. IV.14a - m exemplarisch wiedergegeben. Bei diesem Experiment betrug die Zelldichte 1,0 x 10^8 Tryp./ml. Die Zugabe von Pentalenolacton (1,3 mg/ml bzw, 12,5 mg/ml) erfolgte 15 min. nach dem Inkubationsbeginn. Da unmittelbar zum Zeitpunkt der Pl-Zugabe keine Proben entnommen werden konnten, wurde der Kurvenverlauf zwischen den Meßpunkten 10 min. und 20 min., dort, wo es sinnvoll war, extrapoliert (---). Man erkennt hier deutliche Unterschiede zwischen dem einfach zusammengesetzten HEPES- und dem komplexen Kultivierungsmedium. Auffallend sind dabei vorallem die ausgesprochen hohen Pyruvat-Konzentrationen (20 mM in 75 min.), die im Kultivierungsmedium gebildet werden, während in HEPES-Medium während des gleichen Zeitraums kaum mehr als 8 mM entstehen. Es ist bemerkenswert, daß auch in den anderen Medien nur ein Maximal-Wert von etwa 5 - 7 mM Pyruvat zu erreichen war. Das liegt zum Teil vielleicht in der höheren Pufferkapazität des Kultivierungsmediums, zum anderen aber auch ganz sicher darin, daß es auf die Bedürfnisse der Trypanosomen optimal zugeschnitten ist. Erstaunlich ist weiterhin, daß im Kultivierungsmedium (und übrigens auch in W/AB 77) geringere GAP-DH - Aktivitäten auftraten als im HEPES-Medium. Dieses Phänomen ist bislang nicht geklärt.

Medium	Zusätze	Überlebenszeit der Kontrollen	MHK (Pl-Konz.)	Eintritt der Pl-Wirkung	Zelldichte
W / AB 77 Medium	0,7 mM Glucose	~30 min.	-	-	$5,3 \times 10^7$
	0,7 mM Glucose 20 mM Glutamin	~30 min.	-	-	$3,2 \times 10^7$
	0,7 mM Glucose 1 mM Oleat	~30 min.	-	-	$1,2 \times 10^8$
	5,5 mM Glucose	>60 min.	3,3 - 13,3 µg/ml	20 - 30 min.	$7,4 \times 10^7$
	50 mM Glucose	>60 min.	3,3 - 12,5 µg/ml	20 - 30 min.	$5,0 \times 10^7$
	50 mM Glucose 300 µM Thiamin	>60 min.	3,3 x 13,3 µg/ml	20 - 30 min.	$5,0 \times 10^7$
Kult.- Medium	ohne Glucose	<15 min.	-	-	$5,0 \times 10^7$
	11 mM Glucose 15 % RSA	>60 min.	~5 µg/ml	20 - 30 min.	$1,8 \times 10^8$
	11 mM Glucose 15 % RSA 10 mM Carnitin 10 mM Threonin	>60 min.	~5 µg/ml	20 - 30 min.	$1,8 \times 10^8$
	13 mM Glucose 15 % RSA 10 mM Carnitin 10 mM Threonin Pl-Zusatz erst nach 15 min.	>60 min.	~5 µg/ml	20 - 30 min. nach Pl-Zugabe	$1,0 \times 10^8$

Medium	Zusätze	Überlebenszeit der Kontrollen	MHK (Pl-Konz.)	Eintritt der Pl-Wirkung	Zelldichte
HEPES-Medium	ohne Zusätze	<15 min.	-	-	$5,3 \times 10^7$
	0,7 mM Glucose	~30 min.	-	-	$3,2 \times 10^7$
	5,5 mM Glucose	>60 min.	~3,3 µg/ml	nach ~10 min.	$7,4 \times 10^7$
	11 mM Glucose	>60 min.	~3,3 µg/ml	nach ~10 min.	$1,0 \times 10^8$
	50 mM Glucose	>60 min.	~3,3 µg/ml	nach ~10 min.	$5,7 \times 10^7$
	11 mM Glucose, 10 mM Carnitin, 10 mM Threonin	>60 min.	~3,3 µg/ml	nach ~10 min.	$2,5 \times 10^8$
	ohne Glucose, 10 mM Carnitin, 10 mM Threonin	<15 min.	-	-	$2,0 \times 10^7$
Medium nach Cross und Manning	5 mM Glucose	>60 min.	~2,4 µg/ml	~10 min.	$8,5 \times 10^7$
	13 mM Glucose	>60 min.	~2,4 µg/ml	~10 min.	$4,0 \times 10^8$
	13 mM Glucose	>60 min.	~2,4 µg/ml	~10 min.	$8,0 \times 10^7$
	13 mM Glucose mit Vitaminen	>60 min.	~2,4 µg/ml	~10 min.	$2,5 \times 10^8$

Tab. IV.2: Einfluß verschiedener Medien und Zusätze auf die Lebensfähigkeit von Trypanosomen in Suspension (Überlebenszeit der Kontrollen), die minimale Hemmkonzentration (MHK) und den Eintritt der Pl-Wirkung, d.h., den Zeitpunkt, zu dem die Parasiten unbeweglich werden.

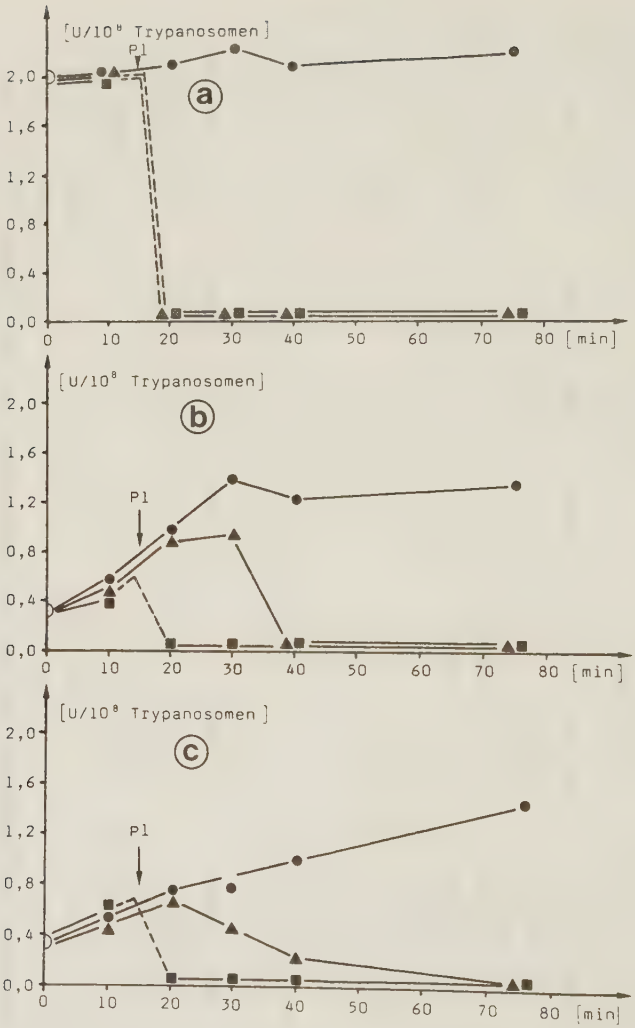


Abb. IV.13: Bestimmung der GAP-DH - Aktivität in verschiedenen Medien.
(●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,3 µg Pl/ml, (■) = 13 µg Pl/ml,
a) HEPES-Medium, b) Kultivierungsmedium (MEM),
c) Kult.-Medium (MEM) mit Carnitin und Threonin.

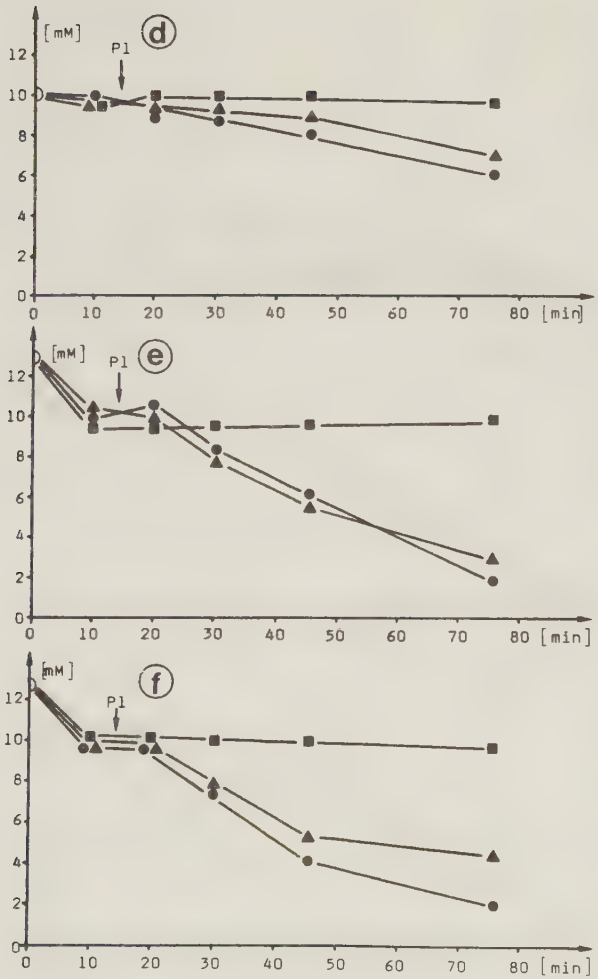


Abb. IV.13: Bestimmung der Glucose-Konzentration in verschiedenen Medien.
(●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,3 µg Pl/ml, (■) = 13 µg Pl/ml.
d) HEPES-Medium, e) Kultivierungsmedium (MEM),
f) Kult.-Medium (MEM) mit Carnitin und Threonin.

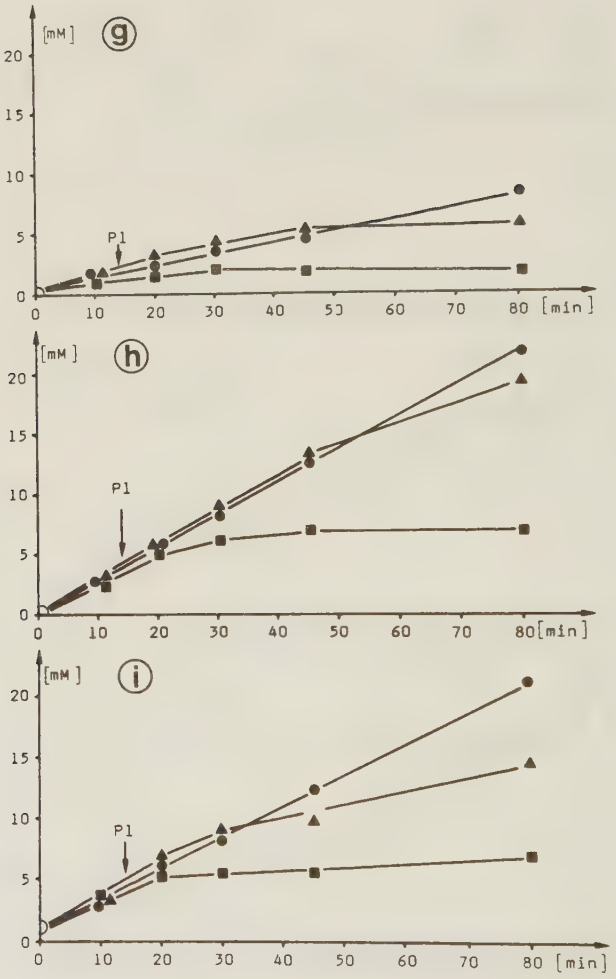


Abb. IV.13: Bestimmung der Pyruvat-Konzentration in verschiedenen Medien.
(●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,3 µg Pl/ml, (■) = 13 µg Pl/ml.
g) HEPES-Medium, h) Kultivierungsmedium (MEM),
i) Kult.-Medium (MEM) mit Carnitin und Threonin.

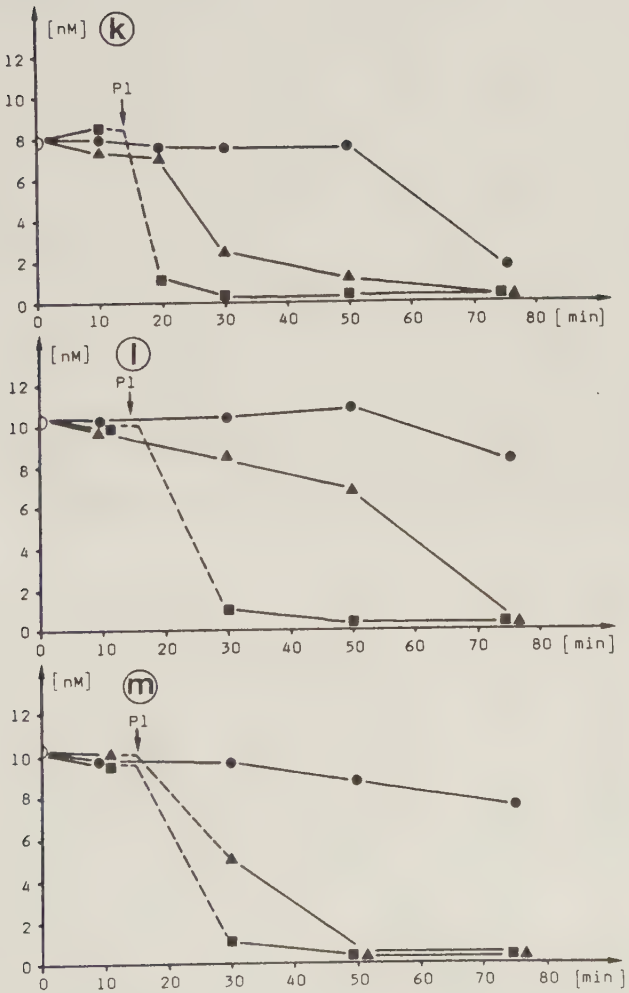


Abb. IV.13: Bestimmung der ATP-Konzentration in verschiedenen Medien.
(●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,3 µg Pl/ml, (■) = 13 µg Pl/ml.
k) HEPES-Medium, l) Kultivierungsmedium (MEM),
m) Kult.-Medium (MEM) mit Carnitin und Threonin.

Im Rahmen dieser Untersuchungen mit verschiedenen Medien wurden auch Experimente mit Salicylhydroxamsäure (SHAM) durchgeführt. Wie bereits ausgeführt wurde, ist SHAM ein Inhibitor der Glycerin-3-Phosphat-Oxadase, der allerdings weder in situ, noch in Suspensionen letal wirkt. Hier sollte untersucht werden, ob der gemeinsame Einsatz von Pentalenolacton und SHAM in situ erfolgreich ist und das Wachstum der Parasiten, da so beide "Äste" der Glykolyse gehemmt werden sollten (vergl. Abb. IV.5), verhindert werden kann. Dazu wurden zunächst Versuche mit Trypanosomen-Suspensionen durchgeführt, wobei unter SHAM-Einfluß etwa gleichgroße Mengen an Pyruvat und Glycerin gebildet wurden (vergl. 127), während mit Pl und SHAM eine sofortige und totale Hemmung der Glycolyse eintrat, ebenso wie mit Pl allein (Abb. IV.14). Die Zelldichte betrug im dargestellten Versuch $1{,}1 \times 10^8$ Trypanosomen/ml und die Inkubation erfolgte unter den üblichen Bedingungen in HEPES-Medium. Gemäß den Literaturangaben (127) wurde eine 0,1 M SHAM-Lösung in Dimethylformamid (DMFA) verwendet, von der entsprechende Mengen zu den Suspensionen supplementiert wurden; die Endkonzentration von SHAM betrug 1 mM.

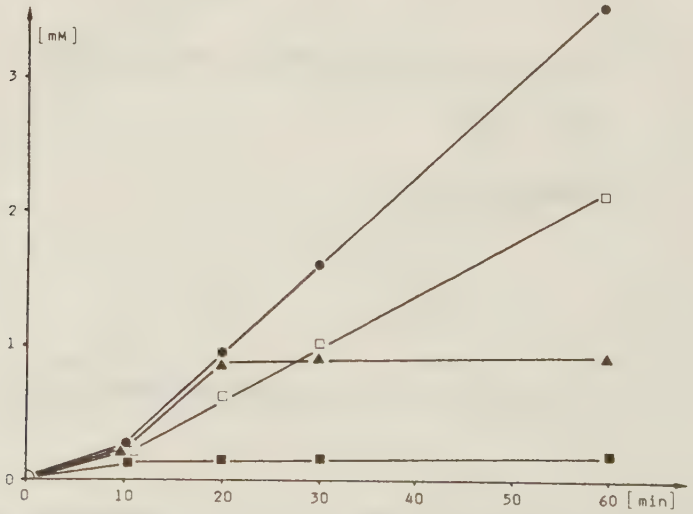


Abb. IV.14 a: Pyruvat-Bestimmung in HEPES-Medium. (●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 2,5 µg Pl/ml, (■) = 10 µg Pl/ml + 1 mM SHAM, (□) = 1 mM SHAM.

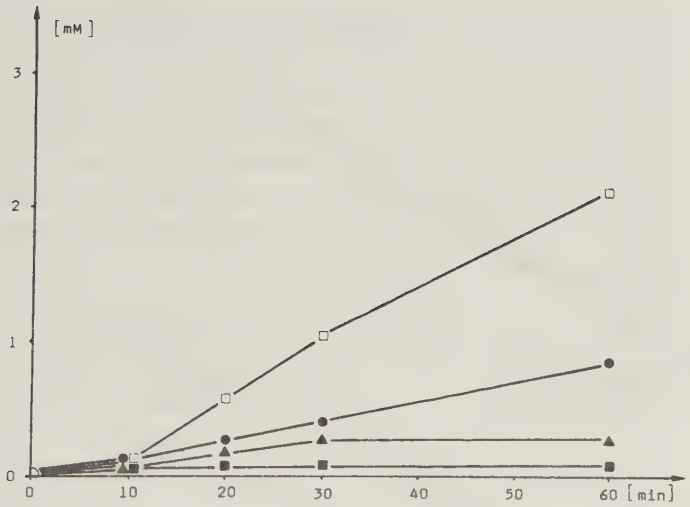


Abb. 14 b: Glycerin-Bestimmung in HEPES-Medium. (●)=Kontrolle, (▲)= 2,5 µg Pl/ml, (■)=10 µg Pl/ml + 1 mM SHAM, (□)=1 mM SHAM.

Für die in situ - Experimente wurde einerseits Pl-Stammlösung in Äthanol und SHAM-Stammlösung in DMFA gleichzeitig appliziert (stets i.p.), zudem aber auch eine gemeinsame Stammlösung in Äthanol/Wasser (4 mg Pl und 15 mg SHAM in 300 µl Äthanol gelöst und mit physiol. NaCl auf 1 ml aufgefüllt). Im Verlauf dieser Versuche wurden Pl-Konzentrationen bis zu 500 µg/Tier und SHAM-Konzentrationen sogar bis zu 2 mg/Tier eingesetzt. Dabei zeigte sich jedoch in keinem Fall eine signifikante Abnahme der Parasitendichte, und die so behandelten Mäuse starben stets etwa zur gleichen Zeit wie die nicht behandelten, aber ebenfalls infizierten Kontrolltiere.

e) Wird Pentalenolacton von Trypanosomen unter in situ - Bedingungen aufgenommen? Wie gezeigt wurde, war es nicht möglich, die Trypanosomen unter in situ - Bedingungen durch Pl-Behandlung zu schädigen. Wurde aber SC-Blut bzw. heparinisiertes Blut aus einer infizierten Maus entnommen und Pentalenolacton zugesetzt, so wurden die Trypanosomen nach etwa 30 - 60 min. bewegungsinaktiv und gingen zugrunde. Dieses Blut war dann nicht mehr infektiös. Abb. 15 a - c zeigte eine Gegenüberstellung der Pl-Wirkung auf die Pyruvat- bzw. Lactat-Bildung in HEPES-Medium und in he-

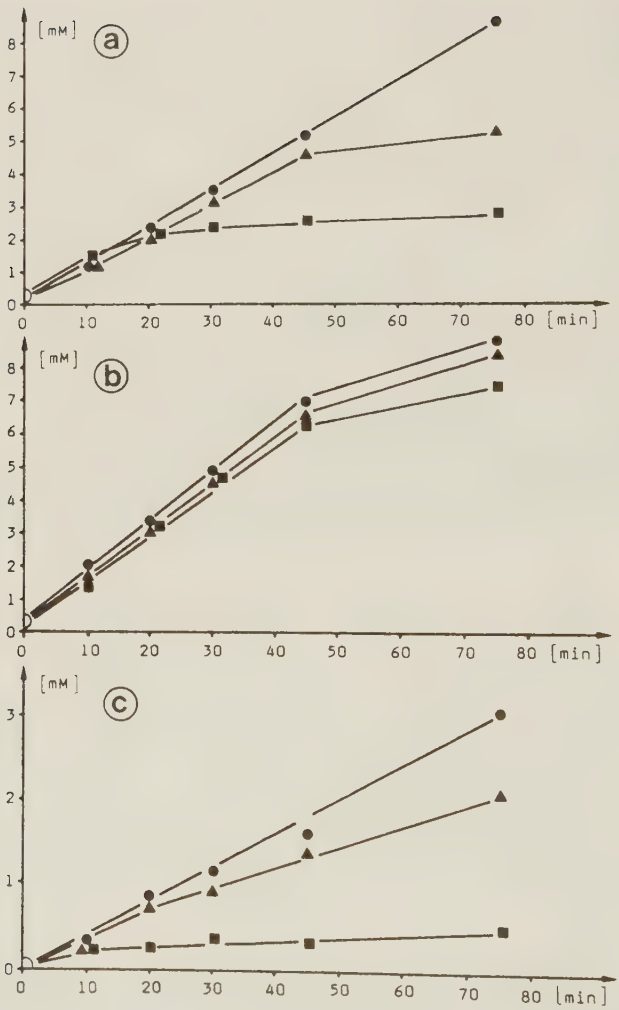


Abb. IV.15: Pyruvat- und Lactat-Bestimmung in verschiedenen Medien. (●) = Kontrolle ohne Pl, (▲) = 1,3 µg Pl/ml, (■) = 13 µg Pl/ml

a) Pyruvat-Bestimmung in HEPES-Medium, b) Pyruvat-Bestimmung in Vollblut, c) Lactat-Bestimmung in Vollblut.

parinisiertem Vollblut. Die Parasitenkonzentration war in beiden Fällen 8,5 x 10^7 Tryp./ml. Wie man sieht, setzt im HEPES-Medium die Pl-Wirkung etwa 10 - 15 min. nach der Zugabe ein, während sie im Vollblut erst nach etwa 60 min. sichtbar wird (vergl. mikroskopische Kontrolle). Die Erythrocyten wurden aber bereits nach 5 min. massiv geschädigt (Lactat-Bestimmung). Man erkennt deutlich das veränderte Verhalten von isolierten Trypanosomen in HEPES-Medium. Dabei ist zwar die minimale Hemmkonzentration nicht wesentlich erhöht, die Zeitdauer bis zum Eintritt der Pl-Wirkung ist jedoch erheblich verlängert.

Zeit nach Pl-Zugabe	HEPES-Medium			Vollblut		
	Kontrolle	2 µg/ml	10 µg/ml	Kontrolle	2 µg/ml	10 µg/ml
30 min.	+++	+++	+	+++	+++	+++
50 min.	+++	++	-	+++	+++	+++
75 min.	+++	-	-	+++	+++	-

Tab. IV.3: Mikroskopische Kontrolle der Trypanosomen-Beweglichkeit in verschiedenen Medien bei Pl-Belastung.
(+++)=90 - 100 % bewegliche Trypanosomen
(++)=40 - 50 % bewegliche Trypanosomen
(+)=10 - 20 % bewegliche Trypanosomen
(-)=keine, bzw. nur vereinzelt bewegl. Trypanosomen.

Nebenbei wurde mit hochinfiziertem Blut, das durch Pl-Behandlung nicht mehr infektiös war, eine Immunisierung gesunder Tiere versucht. Diese Versuche verliefen aufgrund der Existenz variabler Antigene negativ, allerdings ergaben sich, verglichen mit den Kontrollen, stets deutlich verlängerte Überlebenszeiten dieser Tiere, wenn sie zwischen dem 4. und 16. Tage nach der Behandlung mit lebenden Trypanosomen reinfiziert wurden. Während die Kontrolltiere in der Regel nach 3 Tagen starben, überlebten die mit inaktiven Trypanosomen vorbehandelten Tiere zwischen 6 und 9 Tage. Auch in diesen Vorversuchen zeigte sich, daß infiziertes Blut etwa 30 min. nach Pl-Zugabe nicht mehr infektiös war, während unbehandeltes Blut auch nach mehr als 1 h ohne Einschränkung als Inokulum verwendet werden konnte.

Der Nachweis der GAP-DH - Aktivität nach in situ - Behandlung mit Pl wurde auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt, die unterschiedliche

Ergebnisse zeigten. Einerseits wurde die Gesamt-Enzymaktivität im Blut zu verschiedenen Zeiten vor und nach Pl-Zugabe bestimmt. Dazu wurden jeweils 5 µl Blut aus der Schwanzvene der Tiere entnommen und in 200 µl HEPES-Medium mit 1 % Triton-x-100 lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge) wurde der Überstand zur GAP-DH - Bestimmung eingesetzt. Dieses Vorgehen schien dadurch gerechtfertigt, daß im Serum zu keiner Zeit freies und aktives Pentalenolacton nachgewiesen werden konnte (vergl. Kap. II). Bei einer Infektionsrate von etwa 1 x 10^9 Tryp./ml zeigte sich dabei eine etwa doppelt so hohe GAP-DH - Aktivität wie im nichtinfizierten Tier. Diese Aktivität ging in beiden Fällen bereits 10 min. nach Pl-Gabe drastisch zurück und blieb auch während der nächsten Stunden auf diesem niedrigen Level stehen. Die nachfolgende Tabelle zeigt ein charakteristisches Beispiel:

Versuchstier	Gesamt-GAP-DH-Akt. (Erythr. bzw. Erythr. + Tryp.) vor Pl-Zugabe	Gesamt-GAP-DH-Akt. (Erythr. bzw. Erythr. + Tryp.) nach Pl-Zugabe	% Hemmung
nicht inf. Tier	13,2 U/ml	0,8 U/ml	94 %
infiziertes T. (1x10^9 Tryp./ml)	26,0 U/ml	4,0 U/ml	85 %

Diese Ergebnis impliziert eine deutliche und rasche Inaktivierung auch der Trypanosomen - GAP-DH, die allerdings weniger stark ausgeprägt ist wie bei den Erythrocyten.

Andererseits wurden die Trypanosomen nach Pl-Behandlung in situ auf übliche Weise isoliert und erst dann zur GAP-DH - Bestimmung verwendet. Hierbei zeigten sich jedoch im Vergleich mit Trypanosomen aus nicht Pl-behandelten Tieren keine, bzw. nur geringe Aktivitätseinbußen.

Wie sich später durch den Zusatz von käuflicher GAP-DH zu Erythrocyten-Lysaten (die aus Pl-behandelten Mäusen stammten) zeigen ließ, ist die rasche Inaktivierung der Trypanosomen - GAP-DH darauf zurückzuführen, daß Erythrocyten geringe Mengen freies Pentalenolacton enthalten, das bei der Lyse freigesetzt wird und dann die im Rohextrakt vorliegende Trypanosomen - GAP-DH inhibiert.

Man kann also aus diesen Ergebnissen schließen, daß Pentalenolacton

unter in situ - Bedingungen nicht von den Trypanosomen aufgenommen wird.

Von den theoretischen Möglichkeiten zur Erklärung des unterschiedlichen Verhaltens von Trypanosomen unter in situ - Bedingungen und in Suspension erwies sich also nur eine als zutreffend, daß nämlich in situ die Aufnahme des Antibioticums verhindert oder verlangsamt ist. Aus diesem Grunde wurde versucht, durch mehrfache Pl-Gabe in relativ kurzen Zeitabständen (bis zu 30 min.) auch in situ eine Inaktivierung der Trypanosomen zu erzielen. Tatsächlich war es durch drei oder mehrfache Applikation von Pl möglich, vorübergehend (etwa 2 - 3 Generationszeiten) eine weitere Zunahme der Parasitenkonzentrationen im Blut zu verhindern, bzw. einen leichten Rückgang der Trypanosomen-Dichte zu erzielen. Als charakteristisches Beispiel sei dabei folgender Versuch angeführt:

Infekt. in situ vor Pl-Zugabe	Pl - Zugabe	Infektion in situ in Stunden nach Pl-Zugabe nach 3 h	Faktor	nach 25 h	nach 30h	Fakt.
$1{,}1 \times 10^9$	3 x 20 µg/Tier	$1{,}9 \times 10^9$	1,7	-	-	
$1{,}1 \times 10^9$	3 x 40 µg/Tier	$1{,}2 \times 10^9$	1,1	-	-	
$1{,}0 \times 10^9$	3 x 80 µg/Tier	nicht auszählbar		$3{,}5 \times 10^7$	$4{,}9 \times 10^7$	1,4

Eine vollständige Klärung der Parasitaemie gelang dabei jedoch nie, außerdem waren zur Erzielung dieser Effekte bereits letale Pl-Dosen notwendig. Geringere Pl-Dosen, z.B. 3 x 20 µg, waren hingegen ohne Effekt. Auch diese Versuche belegen, daß die metabolische Inaktivierung des Antibioticums in situ so rasch erfolgt, d.h., ein genügend hoher Serumspiegel von Pl nur so kurzfristig vorliegt, daß es zwar in Erythrocyten eindringen, von Trypanosomen aber nicht aufgenommen werden kann. Ist das Antibioticum jedoch längere Zeit anwesend, wie z.B. in heparinisiertem Vollblut, so nehmen es auch die Trypanosomen auf und gehen zugrunde.

4. Versuche mit in vitro - Kulturen von Trypanosomen

Zur Prüfung der bisherigen Ergebnisse wurden auch in vitro - Kulturen von Trypanosomen eingerichtet, da diese sowohl gegenüber den in situ - Verhältnissen, als auch gegenüber den Suspensionen deutliche Vorteile besitzen. So vermehren sich die Parasiten in diesem System und sind unter geeigneten Bedingungen kontinuierlich zu züchten, andererseits sind jedoch Beeinflussungen -wie sie durch das Wirtstier auftreten-, etwa die metabolische Inaktivierung von Pentalenolacton, nicht zu befürchten. Es wurden sowohl Blutformen, als auch procyclische Trypanosomen kultiviert, wobei für die Kulturen der Wirbeltierform metabolisch aktive Zellen als "feeder layer" notwendig waren. Dazu wurden hauptsächlich fibroblastoide Embryonalzellen aus Microtus montanus verwendet, doch darüber hinaus gelang es auch, ein Wachstum von Trypanosomen über einem Zellrasen von primären Ratten-Hepatocyten zu erreichen.

a) In vitro - Kulturen der Blutform nach Brun und Jenni: Wie bereits im Abschnitt "Spezielle Methoden" dargestellt, wurden diese Kulturen in aller Regel in "24 well tissue culture clusters®" durchgeführt. Die Parasiten wurden in einer Dichte von 1-2 x 10^5 Tryp./ml ≙ Tryp./well eingesät, wenn der "feeder layer" gerade konfluent wurde. Innerhalb von etwa

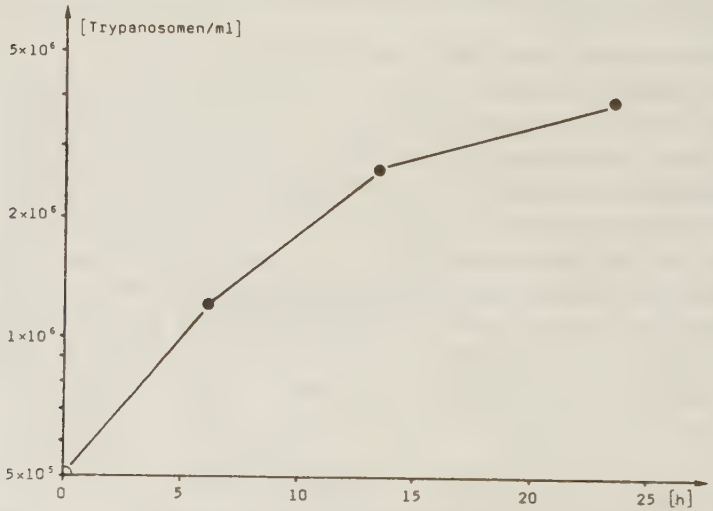


Abb. IV.16: Wachstumskurve von T. brucei STIB 427 in in vitro - Kulturen

20 - 24 h nahm die Trypanosomen-Dichte dann auf etwa 2-4 x 10^6 Tryp./well zu (Abb. IV.16). Zu diesem Zeitpunkt waren die Parasiten fast vollständig aus dem Layer aufgetaucht und bildeten eine mehr oder weniger dichte Population direkt über den Fibroblasten (Abb. IV.17). Die Bestimmung der Trypanosomen-Konzentration ist hier nicht ganz einfach, da die Flagellaten überaus agil sind und die Parasiten-Dichte hoch und nicht an allen Stellen gleichmäßig ist. Zur Zellzahl-Bestimmung wurde ein Foto-Okular verwendet, in dem die Begrenzung des Filmformates eingraviert ist. Da dieses Feld in der Abbildung dem Kleinbildformat (24 x 36 mm) entspricht, kann man für jede beliebige Endvergrößerung des Mikroskops ermitteln, wie groß diese Fläche im Objekt ist. Es wurden darum pro well mehrfach die Trypanosomen innerhalb eines Feldes ausgezählt und dann auf die Gesamtfläche des wells hochgerechnet.

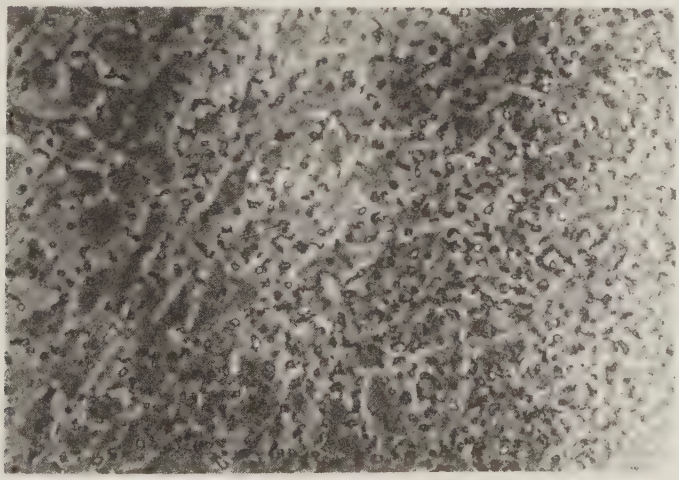


Abb. IV.17: In vitro - Kultur von T. brucei

Einen Tag nach Beginn der Trypanosomen-Kultivierung, also bei Zelldichten von mehr als 1 x 10^6 Tryp./well wurde den Kulturen Pentalenolacton zugesetzt, wobei Konzentrationen von 0,2 µg/ml bis 20 µg/ml zum Einsatz kamen. Die mikroskopische Kontrolle zeigte dabei, daß innerhalb der ersten Stunde nach Pl-Zugabe weder die Trypanosomen-Dichte merklich zurückging, noch deren Beweglichkeit eingeschränkt war. Nach etwa 60 min. wurden jedoch in den Kulturen mit Pl-Konzentrationen von mehr als 5 µg/ml

die Trypanosomen rasch unbeweglich und gingen zugrunde. In Kulturen mit kleineren Pl-Konzentrationen trat dieser Effekt zwar erst einige Zeit später auf, über Nacht waren aber stets in allen mit Pl behandelten Kulturen die Trypanosomen abgestorben (Tab. IV.4).

Pl-Konzentr.	15 min.	30 min.	45 min.	60 min.	75 min.	90 min.	12 h
Kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,2 µg Pl	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
4,0 µg Pl	+++	+++	+++	+++	++	++	-
10,0 µg Pl	+++	+++	+++	++	+	-	-
20,0 µg Pl	+++	+++	++	++	+	-	-

Tabl. IV.4: Mikroskopische Kontrolle der Trypanosomen-Beweglichkeit zu verschiedenen Zeiten nach Pl-Zugabe: (+++)≙ alle Trypanosomen beweglich, (++)≙ 60 - 80 % der Trypanosomen beweglich, (+)≙ weniger als 50 % der Trypanosomen beweglich, (-)≙ keine beweglichen Trypanosomen sichtbar.
Der Versuch wurde mit dem pleomorphen Stamm STIB 247 durchgeführt, wobei jeweils 4 Kulturen ausgewertet wurden. Die Trypanosomen-Dichte zum Zeitpunkt der Pl-Zugabe betrug etwa 2×10^6 Tryp./ml.

Bei einem ähnlichen Versuch wurden bei einer Zelldichte von etwa $0,8 \times 10^6$ Tryp./well ebenfalls verschiedene Pl-Konzentrationen zu den Kulturen gegeben. Nach 3 h wurden dann die Trypanosomen -soweit es möglich war- vollständig entnommen, so daß die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden konnte, die zur Zellzahlbestimmung wesentlich verläßlicher ist.

Pl-Konzentr.	Mikroskopische Kontrolle nach 1 h	2 h	3 h	Tryp.-Konzentration 3 h nach Pl-Zugabe
Kontrolle	+++	+++	+++	$7,0 \times 10^5$
0,2 µg Pl	+++	+++	+++	$6,7 \times 10^5$
1,0 µg Pl	+++	+++	+++	$7,5 \times 10^5$
4,0 µg Pl	+++	++	+	$2,0 \times 10^5$
10,0 µg Pl	++	-	-	keine lebenden Tryp.

Tab. IV.5: Bestimmung der Trypanosomen-Dichte in in vitro - Kulturen, 3 h nach Pl-Zugabe

Natürlich bleibt bei dieser Methode stets ein etwa gleichgroßer Anteil an Trypanosomen im Layer zurück.
Wurde das Medium, nachdem die Trypanosomen aufgrund der Pl-Behandlung zugrunde gegangen waren, gewechselt, so war es möglich, in diesen Ansätzen erneut Trypanosomen zu kultivieren. Somit ist ausgeschlossen, daß die Trypanosomen wegen einer Schädigung des feeder layers zugrunde gegangen sind. Auch wurden innerhalb des hier relevanten Zeitraums von 2 - 3 Tagen nie morphologische Veränderungen an den Fibroblasten beobachtet.
Wie im Blut, so war also auch in Trypanosomen-Kulturen keine rasche Inaktivierung der Parasiten zu erzielen. Es wurden darum nochmals Suspensionen getestet, wobei frisch isolierte Trypanosomen in Kultivierungsmedium aufgenommen und in Zelldichten von $1{,}6 \times 10^6$ Tryp./ml in 1 ml-Ansätzen in Coster wells überführt wurden. Die Inkubaionsbedingungen entsprachen denen der Kultur; es wurden 10 µg und 25 µg Pl pro well eingesetzt. In diesen Suspensionen waren bereits 15 min. nach Pl-Zugabe mehr als 90 % der Trypanosomen bewegungsunfähig, während in den zugehörigen Kontrollen ohne Pl auch nach 2 h noch keine sichtbare Zellschädigung eingetreten war.
Darüber hinaus wurde eine weitere interessante Beobachtung gemacht: Wurden Kulturen mit 10 µg Pl pro well belastet, und dann zu verschiedenen Zeiten nach Pl-Zugabe ein Medienwechsel durchgeführt, so zeigte sich, daß die Trypanosomen in Kulturen, in denen der Medienwechsel innerhalb der ersten 15 min. durchgeführt wurde, überlebten und -nach der Zellverringerung durch den Medienwechsel- wieder zu hohen Zelldichten anwuchsen. Wurde der Medienwechsel jedoch im Zeitraum zwischen 15 min. und 1 h nach Pl-Zugabe durchgeführt, so gingen die Trypanosomen regelmäßig zugrunde, obgleich sie zum Zeitpunkt des Medienwechsels noch normal aktiv waren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Parasiten Pentalenoalcton innerhalb der ersten 15 min. gar nicht, bzw. nur in "ungenügender" Konzentration aufnehmen. Danach nehmen sie Pl dann zwar in solcher Menge auf, daß eine totale Inhibierung der Glykolyse, und damit der Zelltod eintritt, zwischen Aufnahme und Wirkung des Pentalenolactons liegt jedoch eine erhebliche Zeitspanne, in diesen Versuchen etwa 45 min. Da Trypanosomen offensichtlich nicht über ausreichende Energiereserven verfügen, um diese Zeit ohne Glykolyse überdauern zu können (was in den

Suspensionen mit Pl, aber auch bei Substratentzug deutlich wird), müssen hier ebenfalls Transportphänomene in Betracht gezogen werden.
Es wurde auch in diesem System versucht, die Wirkung von Pentalenolacton auf die GAP-DH bzw. auf die Pyruvat-Bildung zu messen. Aufgrund der geringen Zelldichte in den Kulturen war das jedoch nicht möglich. Abb. IV.18 zeigt die Änderung der Metabolit-Konzentrationen (Pyruvat, Lactat und Glucose) im Verlauf der Kultivierung von Microtus montanus - Zellen allein (▲), bzw. in Anwesenheit von Trypanosomen (●). Der Zeitpunkt 0 h bezeichnet die Infektion des feeder layers mit 5 x 10^5 Trypanosomen/well, nach 24 h war die Parasiten-Dichte in den infizierten Kulturen dann auf 4 x 10^6 Tryp./well angewachsen. Es wurden für den Versuch vier infizierte und vier nicht infizierte Kulturansätze eingesetzt, so daß für jeden Meßpunkt Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden (Abb. IV.18).
Wie man aus dieser Abbildung erkennen kann, sind die Zu- bzw. Abnahmen der Metabolit-Spiegel im Verlauf der Kultivierung gering, entsprechend der im Vergleich zu den Suspensionen niedrigen Trypanosomen-Dichte. Im Verlauf von 1 h (dem Zeitraum, der für die Pl-Wirkung ausschlaggebend ist) wurden darum niemals signifikante Änderungen z.B. der Pyruvat-Konzentrationen gemessen. Zur Bestimmung der Pl-Wirkung konnten Metabolit-Bestimmungen somit nicht herangezogen werden. Auch eine verläßliche Bestimmung der GAP-DH - Aktivität war in den in vitro - Kulturen nicht möglich.

b) In vitro - Kulturen der Blutform mit Hepatocyten als feeder layer:
Zusätzlich zum Kultivierungssystem nach Brun und Jenni wurden auch Versuche mit Ratten-Hepatocyten als feeder layer durchgeführt. Dazu wurden Costar wells collagenisiert (83), da sich diese Maßnahme für die Anheftung der Hepatocyten auch in diesen Kulturgefäßen als notwendig erwies. Die Leberzellen wurden hier in 200 µl W/AB-77 - Medium mit Insulin und Dexamethason abgesetzt, wobei in der Regel etwa 2 x 10^5 Hepatocyten pro well eingesät wurden. Nach dem Absetzen der Zellen wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt und die Hepatocyten 1 Tag kultiviert, wobei sich die Zellen normal ausbreiteten und einen dichten Zellrasen ausbildeten. Am nächsten Tag wurde ein erneuter Medienwechsel durchgeführt und 1 h später schließlich pro well wie üblich etwa 5 x 10^5 Trypanosomen zugesetzt. Die hierbei verwendeten Medien waren W/AB-77 mit 10 % foetalem Rinderserum (FBS), MEM mit 15 % Kaninchenserum und Leibivitz L-15 mit

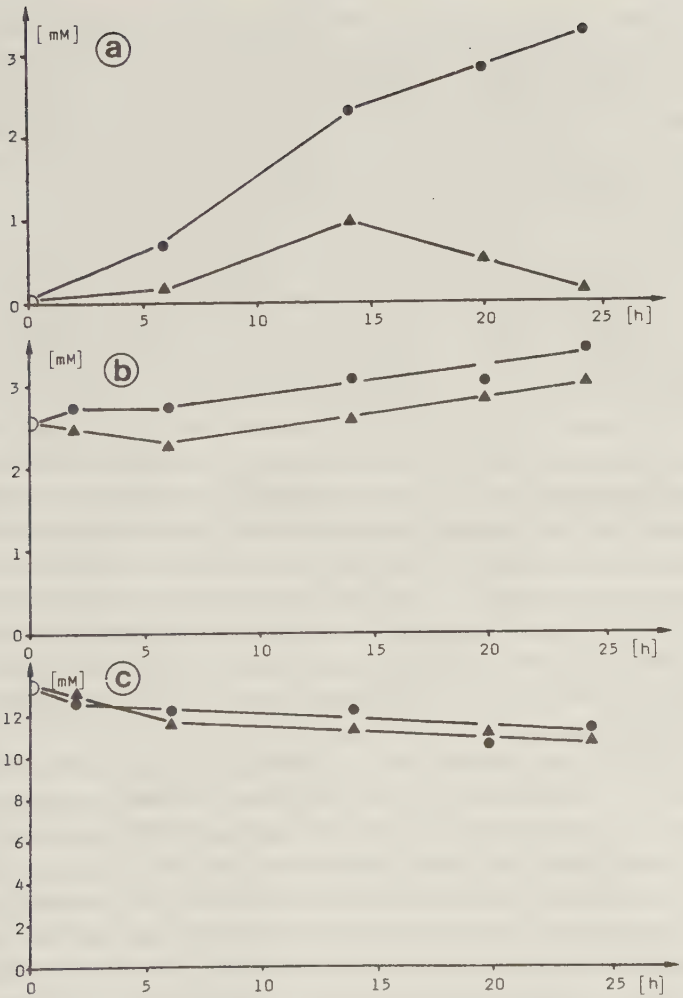


Abb. IV.18: Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen im Verlauf einer in vitro - Kultur von Trypanosomen. Die Kulturen wurden zum Zeitpunkt 0 h durch Zusatz von $1x10^5$ Tryp./well gestartet, nach 24 h war die Parasiten-Konzentration auf $4x10^6$ Tryp./ml angewachsen. (●)= feeder layer mit Trypanosoma brucei STIB 427 (▲)= feeder layer allein, a) Pyruvat-Best., b) Lactat-Best., c) Glucose-Bestimmung.

10 % FBS. Es zeigte sich, daß innerhalb von 24 h allein mit L-15 - Medium ein ebenso starkes Zellwachstum der Trypanosomen stattfand, wie in Kulturen mit Fibroblasten aus Microtus montanus. Im gleichen Zeitraum waren die Parasiten in den anderen Medien zwar noch völlig bewegungsaktiv, die Zelldichte hatte sich jedoch nicht wesentlich verändert, d.h., eine signifikante Parasitenzunahme hatte nicht stattgefunden. Die Hepatocyten sahen in allen Medien normal aus. Optimale Bedingungen wurden dabei durch folgendes Vorgehen erreicht: Das Absetzen der Hepatocyten erfolgte in 200 µl W/AB-77 - Medium mit Insulin und Dexamethason, so wie es sich für Hepatocyten-Kulturen bewährt hat (83). Die Costar wells wurden 30 min. bei Raumtemperatur und ohne CO_2-Begasung stehen gelassen, dann wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 500 µl Leibovitz L-15 - Medium mit 10 % FBS ersetzt. Die Kulturen wurden ~15 h im Brutschrank bei 37°C ohne CO_2-Begasung inkubiert, anschließend erfolgte ein neuer Medienwechsel wie zuvor und dann die Infektion mit Trypanosomen, zumeist mit dem pleomorphen Stamm STIB 366. Bei einer Einsaat von ~5 x 10^5 Tryp./ml wuchsen die Parasiten innerhalb von 24 h ebenso wie im System nach Brun und Jenni auf etwa 2-4 x 10^6 Tryp./ml an.
In Bezug auf die Pl-Sensitivität wurden hier die gleichen Ergebnisse erzielt wie in den Kulturen mit Fibroblasten als feeder layer, d.h., eine Inaktivierung der Trypanosomen trat erst ~1 h nach Pl-Zugabe (5 µg - 20 µg Pl) auf.
Erstaunlich war hingegen, daß bei diesen Versuchen die besten Ergebnisse mit L-15 - Medium erzielt wurden, da dieses Medium keine Glucose, sondern Galaktose enthält (ein geringer Glucose-Anteil von etwa 1 mM wird allerdings durch das Serum eingeschleppt). Es wurde darum kontrolliert, ob Trypanosomen auch Galaktose verwerten können. Dazu wurden isolierte Trypanosomen (1 x 10^8 Tryp./ml) in L-15 - Medium ohne Serum aufgenommen, wobei sich jedoch zeigte, daß alle behandelten Parasiten innerhalb von 10 min. bewegungsinaktiv wurden und zugrunde gingen. Da Trypanosomen Galaktose offenbar nicht als Substrat akzeptieren können, wurde der Glucose-Level in den Kulturen gemessen. Die Hepatocyten wurden dazu wie oben beschrieben abgesetzt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt (L-15 - Medium mit 10 % FBS) und 2 h später erfolgte die Infektion mit Trypanosomen, wobei pro well 1,7 x 10^5 Parasiten zugesetzt wurden. Eine im Anschluß daran durchgeführte

Glucose-Bestimmung lieferte den Wert von 1,04 mM ± 0,11 mM bei 8 Meßwerten. 24 h später wurde erneut die Glucose-Konzentration bestimmt, wobei 0,60 mM ± 0,04 mM Glucose gemessen wurde, ebenfalls in 8 wells. Die Trypanosomen waren zu diesem Zeitpunkt in allen wells auf etwa 2 x 10^6 Tryp./ml angewachsen. Es wurde ein erneuter Medienwechsel durchgeführt, wobei die meisten Trypanosomen entfernt wurden. Nach weiteren 24 h war die Trypanosomendichte wiederum auf etwa 1-2 x 10^6 Tryp./ml angewachsen und die Glucose-Konzentration betrug 0,59 mM ± 0,01 mM in 8 wells. Da der Glucose Bedarf der Parasiten innerhalb von 24 h sicher höher ist als etwa 0,5 mM, scheint also eine relativ konstante Homöostase an Glucose vorzuliegen, die offensichtlich durch die Hepatocyten eingestellt wird.

c) In vitro - Kulturen von procyclischen Trypanosomen: Einige wenige Versuche wurden auch mit procyclischen Trypanosomen-Kulturen durchgeführt, wobei in der Regel pleomorphe Stämme, zumeist STIB 366 (zuweilen aber auch der monomorphe Stamm STIB 427), verwendet wurden. Dazu wurden Blutformen des jeweiligen Stammes, d.h., entweder frisch isolierte Trypanosomen aus einer Maus oder Stabilate, in entsprechendes Kultivierungsmedium (mit Citrat, vergl. 112) überführt und (ohne feeder layer) im Dunkeln bei 28°C ohne CO_2-Begasung inkubiert. Die Experimente wurden in T-25-Flaschen, in einem Ansatz von 3 ml ausgeführt, und das Inokulum betrug zumeist 2 x 10^6 Tryp./ml. Nach 12 - 24 h war hier die überwiegende Anzahl der Trypanosomen transformiert, so daß nur noch vereinzelt Blutformen zu sehen waren. Procyclische Formen zeigen ein charakteristisches Erscheinungsbild (Abb. IV.19) und sind im Mikroskop deutlich von den Blutformen zu unterscheiden.
Aufgrund des vorgelagerten Geißelursprungs resultiert ein charakteristisches Schwimmverhalten und man hat im nativen Präparat den Eindruck, daß sich das Hinterende in Ruhe befindet, während der vordere Körperpol (bedingt durch die Flagellumtätigkeit) heftige Bewegungen ausführt.
Es transformierte hierbei nur ein Teil der Blutformen-Trypanosomen, so daß es zunächst zu einer Abnahme der Gesamt-Parasitenzahl pro Kulturflasche kam. Nach etwa 1 - 2 Wochen wuchsen die procyclischen Formen dann jedoch zu Dichten von etwa 1 x 10^7 Trypanosomen/ml heran. Ein Medienwechsel wurde während dieser Zeit nicht durchgeführt. Kulturen mit

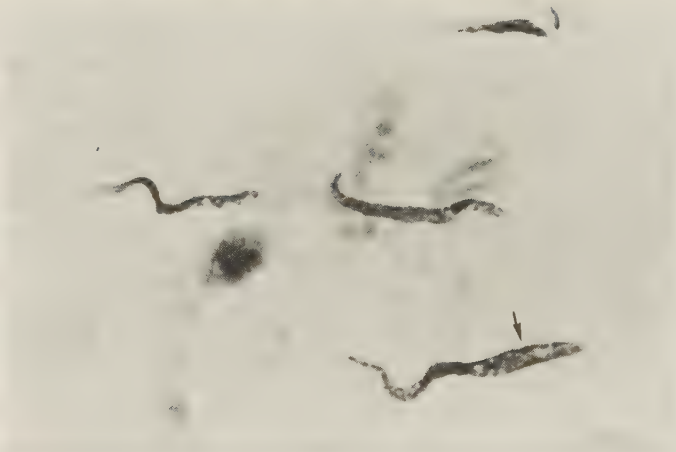


Abb. IV.19: Nach Giemsa gefärbter Ausstrich von procyclischen Trypanosomen. Der Pfeil bezeichnet die Lage der Flagellumtasche. Vergrößerung: 1500 : 1.

einer Zelldichte von etwa 1 x 10^7 Tryp./ml werden gewöhnlich gesplittet und die Parasiten kontinuierlich weitergezüchtet. In allen durchgeführten Versuchen waren procyclische Trypanosomen stets unempfindlich gegenüber Pentalenolacton und zeigten keine Beeinflussung durch das Antibioticum. Im nachstehend dargestellten Experiment (Abb. IV.20) wurden die Kulturen mit Stabilaten des Stammes STIB 427 gestartet. 16 Tage später waren die procyclischen Trypanosomen zu gut meßbaren Zelldichten herangewachsen (Zeitpunkt 0 h im Diagramm). Die Zelldichte wurde nun täglich kontrolliert, wobei zu 3 Kulturen nach 36 h Pentalenolacton zugesetzt wurde. Die hier verwendeteten Pl-Konzentrationen betrugen 15 µg/ml, 38 µg/ml und 75 µg/ml (in in vitro - Kulturen der Blutformen führten bereits 15 µg/ml nach 1 h zu einer vollständigen Inaktivierung der Trypanosomen). Im mikroskopischen Bild zeigte sich während der nächsten 3 h jedoch keinerlei Beeinträchtigung der Parasiten, so daß über Nacht weiterinkubiert wurde. Doch auch 24 h nach Pl-Zugabe waren weder unbewegliche Trypanosomen sichtbar, noch wurde eine verringerte Zelldichte registriert (vergl. Abb. IV.20).

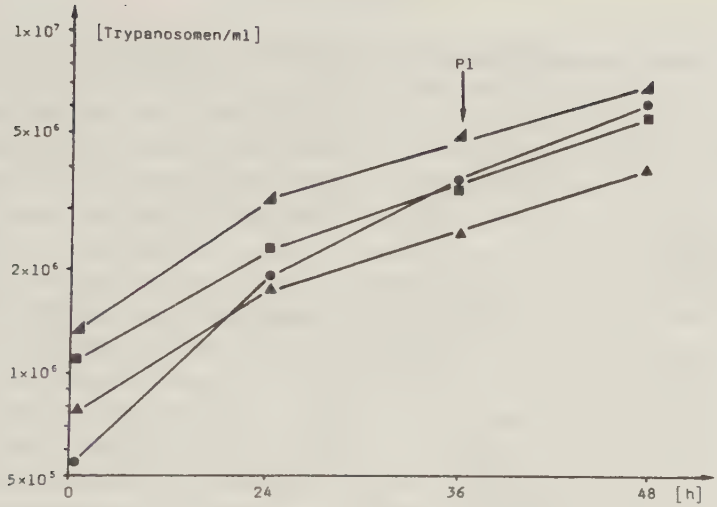


Abb. IV.20: Wachstumskurven von procyclischen Trypanosomen.16 Tage nach Start von procyclischen Kulturen mit Blutformen von STIB 427 wurde die erste Bestimmung der Zelldichte durchgeführt (Zeitpunkt 0 h). 36 h später wurde 3 Kulturen Pentalenolacton zugesetzt.
(●)= Kontrolle ohne Pl, (■)= Zusatz von 15 µg Pl/ml
(▲)= Zusatz von 38 µg Pl/ml, (◢)= Zusatz von 75 µg Pl/ml.

Gegenüber den Blutformen-Kulturen, wo auch noch 0,2 µg Pl/ml über Nacht zum Zelltod der Parasiten geführt haben, waren in Kulturen mit procyclischen Trypanosomen auch etwa 400fach höhere Pentalenolacton-Konzentrationen ohne Effekt. Hier zeigte sich also ebenfalls, wie zuvor bei den Hepatocyten, daß Organismen, die ausschließlich oder vornehmlich ihren Energiestoffwechsel über die Atmungskette betreiben, durch Pentalenolacton nicht geschädigt werden.
Procyclische Trypanosomen dieser Kulturen wurden als Inokulum auf Labortiere übertragen, wobei Parasiten-Konzentrationen bis zu 1 x 10^7 proc. Tryp./Maus i. p. gespritzt wurden. Die Trypanosomen erwiesen sich dabei stets als nichtinfektiös.

5. Isolierung und Charakterisierung der GAP-DH aus T. brucei

Um verläßliche Aussagen über die Empfindlichkeit der Trypanosomen - GAP-DH gegenüber Pentalenolacton -auch im Vergleich zu GAP-DH´s aus anderen Organismen- zu erhalten, wurde das Enzym aus T. brucei STIB 427 isoliert. Dabei konnten auch einige weitere Charakteristika des T. brucei-Enzyms bestimmt werden.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß das Enzym im Rohextrakt (Aufschluß mit Triton-x-100) im Alkalischen (pH 8.5) außerordentlich instabil ist, wobei nach 1 h nur noch 37 % der Ausgangsaktivität vorlagen. Dieses Verhalten ist ungewöhnlich, da GAP-DH´s aus anderen Organismen (z.B. Kaninchenmuskel, Streptomyceten, E. coli) bei pH-Werten über 8.0 sehr stabil sind. Andererseits erfolgte nach einem Zellaufschluß mit dest. Wasser eine über 4 h dauernde kontinuierliche Zunahme der GAP-DH - Aktivität von anfänglich 0,39 U/ml bis schließlich 1,00 U/ml. Dieses Verhalten zeigt, daß die Glycosomen,, in denen die GAP-DH ja enthalten ist (155 - 160), in Wasser offenbar nicht spontan lysieren, sondern sich erst im Verlauf mehrerer Stunden vollständig auflösen.

Zeit	Aufschluß in KPP mit 1 % Triton-x-100 pH 8.5		Aufschluß in Aqua dest.	
	U/ml	% Restakt.	U/ml	Akt.-Zunahme (Faktor)
0 min.	0,87	100 %	0,39	1,0
15 min.	0,69	79 %	0,55	1,4
30 min.	0,50	57 %	0,65	1,7
60 min.	0,32	37 %	0,80	2,1
120 min.	0,28	32 %	0,82	2,1
180 min.	0,22	25 %	0,96	2,5
240 min.	0,18	21 %	1,03	2,6
300 min.	0,16	18 %	1,00	2,6

Tabl. IV.6: Zu- bzw. Abnahme der GAP-DH - Aktivität im Rohextrakt bei verschiedenen Aufschlußverfahren.

Hingegen war die Enzym-Aktivität nach Triton-Aufschluß im pH-Bereich zwischen 6 und 7 während 4 h konstant.

Außerdem ergab sich in Vorversuchen, daß die GAP-DH aus Trypanosomen,

wiederum im Gegensatz zu den GAP-DH´s aus anderen Organismen, nicht an Anionenaustauschmaterialien (z.B. DEAC-Sephacel®) bindet, so daß ein Kationenaustauscher verwendet werden muß. Dieses Verhalten ist in sofern vorteilhaft, als artfremde GAP-DH´s, die sich eventuell aufgrund einer geringen Kontamination mit Blutzellen ebenfalls im Rohextrakt befinden, auf diese Weise eliminiert werden. Andere Methoden, z.B. Lyophilisierung des Rohextrakts und Ätherextraktion, wie sie zur Isolierung der Pyruvat-Kinase beschrieben wurden (128),sowie Ammonsufat-Chromatografie erwiesen sich aufgrund der hohen Verluste als unvorteilhaft.

Zur eigentlichen Isolierung wurden 10 hoch infizierte Mäuse (>1 x 10^9 Tryp./ml) verwendet. Das SC-Blut (40 ml) wurde vereinigt, auf 30 ml Ficoll-Paque® überschichtet und wie üblich zentrifugiert. Die isolierten Trypanosomen wurden in HEPES-Medium (mit 10 mM Glucose) aufgenommen und zweimal gewaschen. Hierbei trat im Überstand ein gallertartiges durchsichtiges Material auf, das mit dem trypanosomenfreien Überstand entnommen und zur weiteren Untersuchung im Kühlschrank aufgehoben wurde.

Die gewaschenen Trypanosomen wurden mit Triton-x-100 (1 %) in 125 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.7 aufgeschlossen; die Isolierung der GAP-DH erfolgte mit chromatographischen Methoden (siehe Tabelle IV.7). Das Endprodukt dieser Isolierung war homogen und zeigte in der SDS-Elektrophorese 1 Bande (Abb. IV.21). Das Molekulargewicht der Untereinheit, das auf diesem Wege durch Vergleich der Laufstrecken von Referenzprotein ermittelt werden konnte, beträgt 39 000.

Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde durch Gelchromatografie an Biogel A 0,5m® im Vergleich mit Referenzproteinen ermittelt und beträgt 155 000. Das Enzym liegt folglich -ebenso wie die meisten GAP-DH´s (s. Tabe. IV.10)- als Tetramer vor. Allerdings kann es offenbar durch Alterungsprozesse zum Zerfall des Enzyms in dimere und monomere Einheiten kommen, da bei einer später durchgeführten Molekulargewichtsbestimmung zwei aktive Peaks eluiert wurden, deren Molekulargewichte 80 000 und 36 000 betrugen. Soweit bekannt, ist dies wohl der einzige Fall, wo sowohl monomere als auch dimere und tetramere Einheiten der GAP-DH enzymatisch aktiv sind.

Darauf deutet auch das Verhalten des Enzyms bei der ATP-Inkubation hin.

Reinigungsschritt	Volumen	Vol.-Akt.	Prot.-Konz.	Gesamt-Protein
Rohextrakt	30 ml	4,20 U/ml	3,15 mg/ml	94,5 mg
Cellex-CM	250 ml	0,54 U/ml	0,03 mg/ml	7,5 mg
Dialyse	300 ml	0,45 U/ml	0,02 mg/ml	6,0 mg
Hydroxylapatit	31 ml	1,63 U/ml	0,06 mg/ml	1,8 mg

Reinigungsschritt	Spez.-Akt.	Gesamt-Akt.	Anreicherung	Ausbeute
Rohextrakt	1,3 U/mg	126 U	1,0	100 %
Cellex CM	17,9 U/mg	134 U	13,5	100 %
Dialyse	21,6 U/mg	136 U	16,2	100 %
Hydroxylapatit	26,7 U/mg	50 U	20,1	38 %

Tab. IV.7: Isolierung der GAP-DH aus T. brucei STIB 427 (Reinigungstabelle).

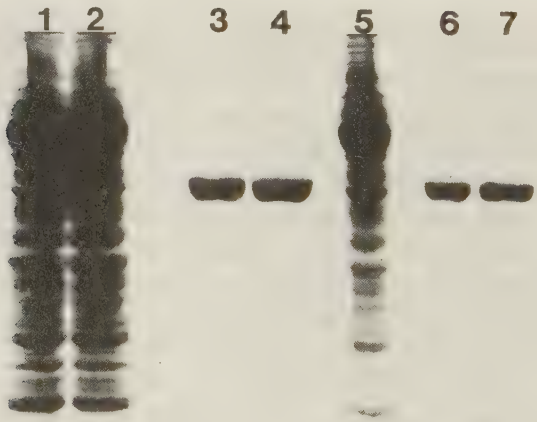


Abb. IV.21: SDS-Gelelektrophorese des Rohextrakts und des Endprodukts der GAP-DH - Isolierung aus T. brucei STIB 427. (Bedingungen s. S. 79/80).
1/2 = Rohextrakt (Probenvolumen (PV) je 20 µl), 3/4 = GAP-DH (PV je 20 µl), 5 = Rohextrakt (PV =10 µl), 6/7 = GAP-DH (PV je 10 µl):

Es ist bekannt, daß GAP-DH durch Inkubation mit ATP in die Untereinheiten zerfällt, die dann nicht mehr aktiv sind. Tab. IV.8 zeigt eine Gegenüberstellung von Kaninchenmuskel-Enzym und GAP-DH aus T. brucei bei Inkubationszeiten von 1 h, 2 h und 4 h. Die ATP-Konzentration betrug in allen Inkubationsansätzen 5 mM. Wie man sieht, tritt durch

Inkubationsdauer GAP-DH + ATP	Restaktivität [%] $GAP\text{-}DH_{(T.\ brucei)}$	Restaktivität [%] $GAP\text{-}DH_{(Kaninchenmuskel)}$
0 min.	100 %	100 %
60 min.	82 %	0 %
120 min.	88 %	0 %
240 min.	91 %	0 %

Tab. IV.8: Einfluß von ATP (5 mM) auf die Aktivität von GAP-DH aus T. brucei und Kaninchenmuskel. Es wurden von beiden Enzymen Ansätze mit und ohne ATP inkubiert, aus denen zu den angegebenen Zeiten jeweils Proben (Doppelbestimmungen) gemessen wurden. Die Restaktivität wurde immer auf die jeweilige Kontrolle bezogen.

diese Behandlung bei GAP-DH aus T. brucei keine signifikante Abnahme der Enzymaktivität ein, während Kaninchenmuskel-Enzym total inhibiert wird. Es wurde hierbei allerdings nicht kontrolliert, ob es zu einem Zerfall des Trypanosomen-Enzyms in die Untereinheiten kommt.
Es wird diskutiert, daß die ATP-Inaktivierung des Enzyms auch intrazellulär von Bedeutung für die GAP-DH - Regulation sein könnte (entsprechend des Pasteur-Effektes). Eine solche Regulation wäre aber für einen Organismus, der offenkundig ausschließlich von der Glykolyse zur Energiegewinnung abhängt, nicht sinnvoll, und unter Umständen sogar fatal.
Zusätzlich wurde untersucht, ob das Enzym auch NADP statt NAD als Coenzym akzeptiert. Hier zeigte sich -ebenso wie im Rohextrakt (vergl. S. 100)- daß die GAP-DH aus T. brucei NAD spezifisch ist und somit dem Typ EC 1.2.1.12 entspricht. Es trat aber bei Vorinkubation des Enzyms

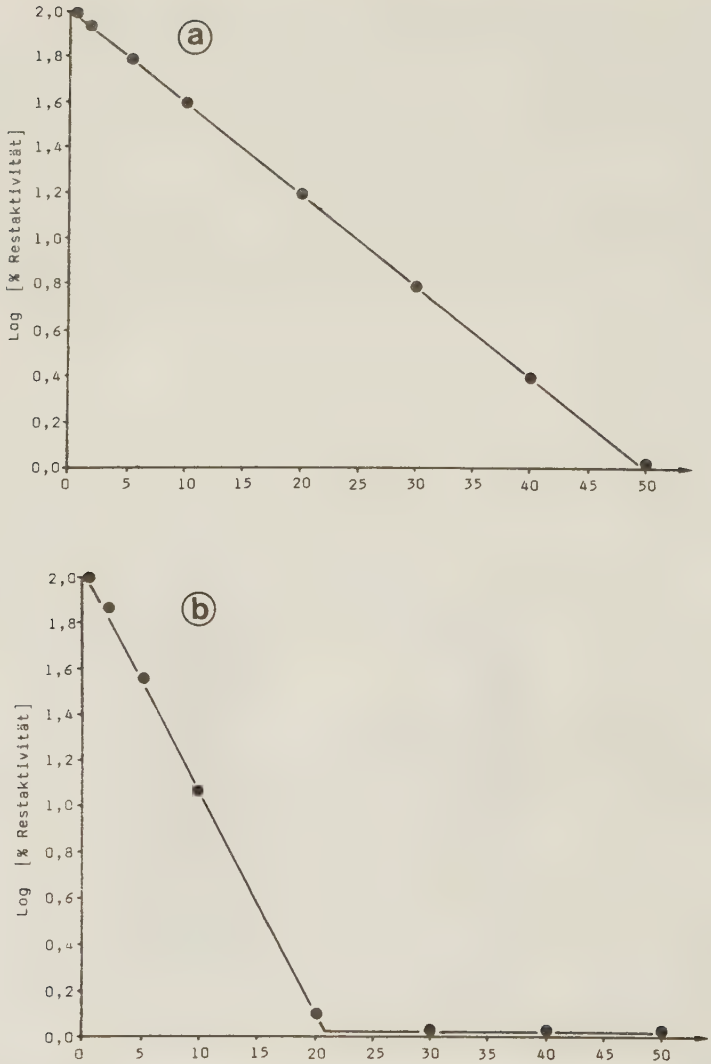


Abb. IV.20: Sensitivität der GAP-DH aus Kaninchenmuskel (a) und aus Trypanosoma brucei STIB 427 (b) für Pentalenolacton. Es wurde der Logarithmus der Restaktivität [%] gegen die Pentalenolacton-Konzentration im Testansatz [ng] aufgetragen.

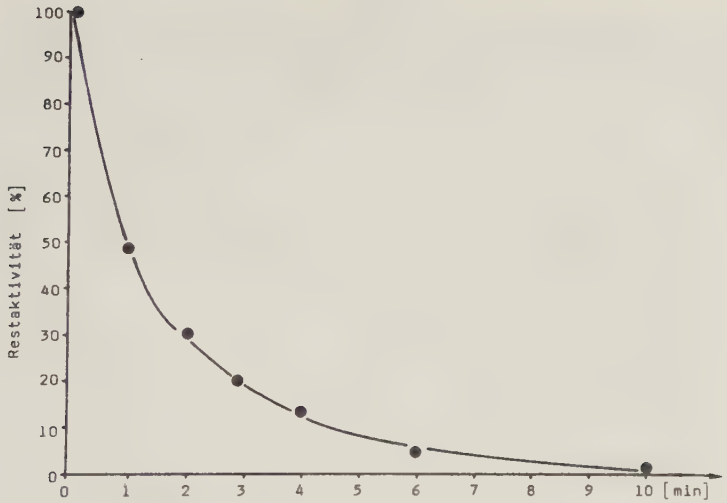


Abb. IV.22: Inaktivierungskinetik der T. brucei - GAP-DH mit 0,5 mM NADP

mit NADP sehr rasch (innerhalb von 10 min.) eine totale Inaktivierung des Enzyms ein (s. Abb. IV.22), die danach durch NAD-Zusatz nicht mehr reversibel war. Wurde die Vorinkubation hingegen mit NAD und NADP gleichzeitig durchgeführt, so blieb die GAP-DH - Aktivität erhalten. Dieses Verhalten ist ebenfalls unüblich und z.B. bei Kaninchenmuskel-Enzym nicht zu beobachten (vergl. Tabelle IV.9). Eine Erklärung für diesen Effekt ist bislang nicht bekannt. Es wäre aber denkbar, daß es eine physiologische Bedeutung bei der Umwandlung von der Blut- zur Vektorform besitzt.

Zur Bestimmung der Hemmwirkung von Pl wurde ein laborübliches Verfahren verwendet, um die Ergebnisse mit bereits bekannten Untersuchungen vergleichen zu können. Dazu wurde eine Pentalenolacton-Stammlösung (5 mg/ml) 1 : 10 000 verdünnt und davon Volumina von 5 - 100 µl dem Inkubationsansatz zugesetzt. Dieser Inkubationsansatz, der bis auf GAP den gesamten Ansatz zur GAP-DH - Bestimmung enthielt (vergl. Anhang), wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, denn wurde die Reaktion mit GAP gestartet. Wie die Abb. IV.23 a und b zeigen, ist die GAP-DH aus T. brucei dabei deutlich empfindlicher als das Kaninchenmuskel-Enzym. Die relative Sensitivität, d.h., die Pl-Menge, die für eine 90 %ige Hemmung des

Enzym	Vorinkubation mit	Inkubat.-Zeit	Enzym-Akt. (mU/ml)	Zusatz von	Enzym-Akt. (mU/ml)
GAP-DH	-	-	-	2,00 mM NAD	534
aus T.	0,13 mM NADP	15 min.	0	2,00 mM NAD	0
brucei	0,64 mM NADP	15 min.	0	2,00 mM NAD	0
	2,54 mM NADP	15 min.	0	2,00 mM NAD	0
	0,64 mM NADP +2,00 mM NAD	15 min.	572	-	-
	0,64 mM NADP +2,00 mM NAD	50 min.	564	-	-
	0,64 mM NADP +2,00 mM NAD	150 min.	562	-	-
GAP-DH	-	-	-	2,00 mM NAD	592
aus KM	0,64 mM NADP	15 min.	41	2,00 mM NAD	575

Tab. IV.9: Einfluß von NADP auf die GAP-DH aus T. brucei und Kaninchenmuskel (KM).

Enzyms notwendig ist, dividiert durch die entsprechende Menge für das Kaninchenmuskel-Enzym, beträgt 0,73. Dies ist bislang der erste Fall, wo ein Enzym eine höhere relative Sesitivität besitzt als die KM - GAP-DH (vergl. Tab. IV.10).

Es wurden auch die K_M-Werte für GAP, NAD und Phosphat bestimmt:

K_M GAP 300×10^{-6} M

K_M NAD 275×10^{-6} M

K_M Phosphat 590×10^{-6} M

Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich, daß dieses Enzym Arsenat nicht als Substrat akzeptiert. Der Testansatz konnte jedoch unverändert verwendet werden, da der Pyrophosphat-Puffer genügend freies Phosphat enthält.

Wie im Abschnitt über den Aufschluß der Trypanosomen bereits angedeutet

Organismus	MG	MG der Unter-einheit	Anzahl d. Unt.-einheiten	K_M-Wert für NAD	K_M-Wert für GAP	Relat. Sensitiv. für Pl (vergl. Text)
Kaninchen-Muskel	146 000	36 500	4	13	90	1
Spinat	145 000	37 000	4	--	--	5,7
Hefe	146 000	36 000	4	44	160	3,2
E. coli	144 000	35 000	4	166	142	1,4
S. arenae TÜ 469						
Pl. sens.	180 000	43 000	4	110	250	100
Pl. insens.	290 000	37 000	8	120	100	10^5
T. brucei	155 000	39 000	4	275	300	0,73

Tab. IV.10: Vergleich von GAP-DH's aus verschiedenen Organismen. Bis auf die T. brucei-Werte wurde die Tabelle von Maurer (28) übernommen.

wurde, entstand beim Waschen der Parasiten mit HEPES-Medium ein gallertartiges, klar-durchsichtiges Material. Die mikroskopische Kontrolle zeigte dabei, daß es sich hier um strukturloses Material handelte, in dem keine Trypanosomen enthalten waren. Das führte zu der Annahme, daß es sich um abgestoßene variable Antigene handeln könnte. Darum wurde das Material, das in der Hauptsache aus Protein bestand, getrocknet und zur Zuckeranalyse herangezogen, die freundlicherweise von Dr. Bauer durchgeführt wurde. Es zeigte sich, daß die Probe die Zucker Glucose, Mannose und Glaktose, sowie zwei Aminozucker, die mit dem zur Verfügung stehenden Analysator nicht eindeutig zu identifizieren waren, enthielten. Da die bisher analysierten Kohlehydrate von variablen Antigenen die Zucker Galaktose, Mannose und den Aminozucker Glucosamin enthalten (die Glucose hier stammt aus dem HEPES-Medium), bestehen starke Evidenzen, daß bei der Isolierung der Trypanosomen der Oberflächencoat vollständig oder teilweise abgestoßen wird. Das Material ist dabei sicher nicht auf abgestorbene Parasiten zurückzuführen, da bei der Isolierung in Bezug zum SC-Blut bei hoher Parasitaemie stets quantitative Ausbeute erhalten wurden. Eine nachfolgende Prüfung in normal großen Ansätzen

(Isolierung aus 1 Tier) zeigte dann auch dort dieses amorphe Material, allerdings in so geringer Menge, daß es zuvor übersehen worden war. Es tauchte jedoch nie bei der Ficoll-Paque®-Isolierung, sondern erst beim Waschen der Trypanosomen in HEPES-Medium auf, und zwar stets im Überstand nach dem ersten Waschen.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, ob glykolyseabhängige Parasiten unter in situ - Bedingungen mit Pentalenolacton selektiv gehemmt werden können. Für diese Experimente schienen Trypanosomen (T. brucei) aus zwei Gründen vorzüglich geeignet: einerseits wiesen alle bekannten Arbeiten (z.B. 113, 120, 123) darauf hin, daß diese Organismen im Wirbeltier-Wirt vollständig oder doch überwiegend auf die Glykolyse zur Energieversorgung angewiesen sind, und zum anderen parasitieren sie stets extrazellulär und ihre fulminante Beweglichkeit ist ein verläßliches Kriterium zur Beurteilung der Zellqualität, so daß die Pl-Wirkung im Mikroskop jederzeit leicht kontrollierbar sein sollte. Wie sich jedoch sehr rasch zeigte, waren Trypanosomen im Wirbeltier durch Pentalenolacton nicht zu beeinflussen. Dabei war weder die Applikationsform, noch die verabreichte Menge von Bedeutung; sogar die mehrfache Letaldosis (bis zu 500 µg/Tier) zeigte keine Wirkung auf die Parasiten. Die Aktivität des Antibioticums war unter diesen Bedingungen jedoch wie üblich vorhanden, was an der Wirkung auf die Erythrocyten kontrolliert werden konnte. Andererseits reagierten isolierte Trypanosomen ebenso empfindlich auf Pentalenolacton wie isolierte Erythrocyten, wobei die Flagellaten innerhalb weniger Minuten bewegungsinaktiv wurden und zugrunde gingen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, daß die in situ erreichten Pl-Konzentrationen prinzipiell zu gering waren, um Trypanosomen zu hemmen, da ja die Erythrocyten lysierten. Darüber hinaus belegen sie aber auch, daß die Parasiten offenbar keine wesentliche Energiereserven besitzen, da sie sonst in Suspension nicht unmittelbar nach Pl-Zugabe zugrunde gehen würden. Dieser Befund wird auch durch Experimente gestützt, bei denen Trypanosomen ohne Substrat inkubiert wurden. Hier trat ebenfalls innerhalb weniger Minuten der Zelltod ein. Zur Klärung dieser stark unterschiedlichen Empfindlichkeit der Trypanosomen gegenüber Pentalenolacton unter in situ - Bedingungen und in Suspension, mußten folglich weitere Möglichkeiten in Betracht gezogen und experimentell geprüft werden.

Dabei ergaben sich niemals Evidenzen dafür, daß die Parasiten bei Pl-Belastung in situ ihre Atmungsketten-Enzyme aktivieren und somit auf

die Glykolyse zur Energieversorgung verzichten könnten. Weder traten morphologische Veränderungen der Trypanosomen nach Pl-Gabe auf, noch zeigten sich im Elektronenmikroskop gut entwickelte Mitochondrien, und auch mit der $NADH_2$-Tetrazoliumsalz-Reaktion nach Vickerman ließ sich keine Aktivität des mitochondrialen Elektronentransportweges nachweisen. Doch auch aus theoretischen Gründen wäre diese Möglichkeit nur schwer verständlich, da die Aktivierung der Atmungskette innerhalb von Minuten vollzogen sein müßte, um die Pl-Wirkung zu kompensieren. Gleichermaßen unwahrscheinlich ist die Annahme, Trypanosomen könnten kurzfristig genügende Mengen aktiven Enzyms bereitstellten, um die Verluste durch Pentalenolacton auszugleichen. Diese Fähigkeit müßte auch in Suspensionen, zumindest aber in isoliertem Blut auftreten, wofür sich jedoch keine Hinweise ergeben haben. Darüber hinaus ließ sich auch zeigen, daß unter in situ - Bedingungen keine Pl-insensitive GAP-DH (z.B. ein NADP-abhängiges Enzym) existiert.

Dagegen konnte nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, daß Trypanosomen neben der Glykolyse noch über weitere energieliefernde Prozesse verfügen. Diese Flagellaten sind schnell wachsende Zellen, und zudem in ausgeprägtem Maße und unablässig bewegungsaktiv. Der Energiebedarf der Parasiten ist also augenscheinlich sehr hoch. Dennoch sind Citratcyclus und Atmungskette, die bekanntlich eine hohe ATP-Ausbeute pro Mol umgesetzten Substrats liefern, hier nicht funktionsfähig, obwohl die genetische Information der Etablierung dieser Stoffwechselwege vorhanden ist und in der Vektorform auch aktiviert wird. Mehr noch: selbst die Verringerung der durch die Glykolyse erreichbare Energieausbeute pro Mol Glucose um 50 % -durch Hemmung der Trypanosomen-Atmung mit Salicylhydroxamsäure- ist für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion offensichtlich noch ausreichend. Aufgrund dieses Phänomens wurden immer wieder Spekulationen geäußert, Trypanosomen könnten noch über weitere energieliefernde Reaktionen verfügen. Erst kürzlich wurden von Gilbert und Klein (131, 164) Ergebnisse publiziert, die eine Stimulierung der ATP-Synthese durch Carnitin aufzeigten. Die Autoren postulierten dabei eine mögliche ATP-Bildung auf der Stufe der Carnitin-Acyl-Transferase, begründet durch das hohe Gruppenübertragungs-Potential von Acetylcarnitin. Wenn solche nichtglykolytischen energieliefernden Reaktionen existieren, dann sollten isolierte Trypanosomen in Suspensionen ebenfalls unem-

pfindlich für Pentalenoalcton sein, sofern ihnen ein geeignetes Substrat zur Verfügung steht. Es wurden darum verschieden zusammengesetzte komplexe Medien, auch unter Verwendung von Carnitin und Threonin eingesetzt, um die Möglichkeit eines bislang nicht bekannten, energieliefernden Prozesses in Trypanosomen zu prüfen. In keinem dieser Fälle konnte jedoch der mehr oder weniger rasche Zelltod durch Pentalenolacton verhindert werden.

Zur endgültigen Klärung wurden schließlich in vitro - Kulturen der Blutform etabliert. In diesen gingen die Trypanosomen zwar ebenfalls durch Pentalenolacton zugrunde, allerdings trat der Effekt hier zeitlich verzögert, frühestens etwa 1 h nach Pl-Zugabe in Erscheinung. Zur Klärung, ob dieses Verhalten auf eine Substratverarmung zurückzuführen ist, wurde zu verschiedenen Zeiten zwischen Pl-Zugabe und Eintritt der Pl-Wirkung ein Medienwechsel durchgeführt. Dabei konnte die Inaktivierung der Trypanosomen dann verhindert werden, wenn der Medienwechsel innerhalb der ersten 15 min. durchgeführt wurde, danach blieb er jedoch wirkungslos. Eine Substratverarmung ist somit sicher auszuschließen. Stattdessen läßt dieses Ergebnis aber vermuten, daß Pentalenolacton unter diesen Bedingungen nicht einfach durch Diffusion in die Parasiten gelangen kann, denn sonst müßte die Wirkung ebenso rasch wie in Suspension auftreten, da hier ja gleiche und höhere Pl-Konzentrationen eingesetzt wurden, als dort für eine rasche Inhibierung notwendig waren. Nimmt man die Existenz eines Transportsystems an, so ist das Verhalten plausibel erklärbar. Innerhalb der ersten 15 min. gelangen nur ungenügende Mengen an Antibioticum in die Zellen, die für eine komplette Hemmung der Glykolyse nicht ausreichen.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß über die Flagellumtasche grössere Moleküle, etwa Proteine, aufgenommen werden können, was experimentell z.B. durch Verwendung von Ferritin nachgewiesen wurde (110). Wie man in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sieht, werden von der Flagellumtasche regelmäßig Vesikeln abgeschnürt, die dann ins Cytoplasma wandern (vergl. Abb. IV.3 und 111).

Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen muß man annehmen, daß Pentalenolacton den vollständigen und intakten Oberflächencoat der Trypanosomen nicht durchdringen kann, und über einen Transportmechanismus, vermutlich die Flagellumtasche, in die Parasiten gelangt. Auf diese

Weise wird die zeitlich verzögerte Pl-Wirkung in den Kulturen verständlich, da sie erst eintreten kann, wenn sich die Vesikeln im Cytoplasma auflösen. Auch die Unempfindlichkeit der Trypanosomen unter in situ - Bedingungen ist durch diese Annahme stichhaltig zu erklären, denn da aufgrund der raschen metabolischen Inaktivierung des Antibioticums (vergl. Kap. II) nicht lange genug ein ausreichender Serumspiegel an Pl erhalten bleibt, ist der Einbau in die Trypanosomen verhindert. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, daß eine kurzzeitige Verlangsamung der Generationszeit durch mehrfache Pl-Applikationen in kurzen Zeitabständen erreicht werden konnte. Allerdings waren zur Hemmung der Trypanosomen in situ letale Pl-Dosen notwendig, so daß es zur Behandlung der Parasitaemie in dieser Form ohne Bedeutung ist.

Wie gezeigt werden konnte, treten bei der Isolierung der Trypanosomen aus dem Blut freie, variable Antigene auf. Da bei der Isolierung zumeist fast quantitative Ausbeuten erzielt wurden (bezogen auf das Sucrose-Citrat-Blut), stammten diese Antigene sicher nicht nur von abgestorbenen Parasiten. Somit erfolgt bei der Isolierung wenn nicht der komplette Verlust, so doch zumindest eine erhebliche Schädigung des Oberflächencoats. Pentalenoalcton könnte dadurch in der Lage sein, mehr oder weniger ungehindert die Membran zu pentrieren, so daß eine vergleichsweise schnelle Blockierung der Glykolyse auftritt und die Trypanosomen zugrunde gehen.

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Trypanosomen reagiert sehr empfindlich auf Pentalenolacton. Das Enzym weist zudem einige unübliche Charakteristika auf, die vielleicht für die intrazelluläre Regulation von Bedeutung sind.

Die hier durchgeführten Experimente belegen eindeutig, daß die Glykolyse für die Blutformen der Trypanosomen unter allen Bedingungen (in situ, in Kultur und in Suspension) essentiell ist und die Hemmung der GAP-DH letale Folgen hat. Hingegen zeigen procyclische Trypanosomen, die bekanntlich gut entwickelte Mitochondrien besitzen, bei Pentalenolacton-Behandlung keine Beeinträchtigung der Zellfunktionen und überleben auch hohe Konzentrationen.

V. Schlußbetrachtung und Ausblick:

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Auswahl verschiedener Eukaryonten eingesetzt, um zu zeigen, ob Pentalenolacton in diesen Zellsystemen einsetzbar ist, und welche Konsequenzen das Antibioticum für den gesamten Stoffwechsel der jeweiligen Zellen hat. Dabei erwies sich, daß prinzipiell in allen verwendeten Zellen -Erythrocyten, Hepatocyten, Ehrlich Ascites Tumor Zellen, Plasmodium vinckei, Plasmodium falciparum und Trypanosoma brucei- die Glykolyse (resp. die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durch Pentalenolacton gehemmt werden konnte. Diese Ergebnisse ergänzen die Beobachtungen von English et al. (22), der eine erhebliche Anzahl gram-positver und gram-negativer Bakterien, sowie verschiedene Pilze und zwei Protozoen (Entamoeba histolytica und Trichomona vaginalis) mit dem Antibioticum hemmen konnte. Pentalenolacton kann somit als universell einsetzbarer Inhibitor für in vivo - Stoffwechsel-Untersuchungen bei Pro- und Eukaryonten angesehen werden. Dieser enorme Einsatzbereich von den einfachsten Protisten bis zu Mammalia-Zellen ist dabei offenabr auf die hohe Konstanz zurückzuführen, die die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase im Verlauf der Evolution bewahrt hat. Ausnahmen sind allerdings dann möglich, wenn die Beschaffenheit der Zelloberfläche das Eindringen von Pentalenolacton in die Zellen verhindert. Ein solcher Effekt trat bislang bei Untersuchungen mit Saccharomyces cerevisiae in Erscheinung, allerdings nur dann, wenn die Hefe unter besonderen Bedingungen gezüchtet wurde (1,21). Hingegen scheint eine modifizierte GAP-DH, wie sie beim Erzeugerstamm Streptomyces arenae TÜ 469 nachgewiesen worden ist (30), eine zumindest seltene Ausnahme zu sein.

Obwohl die Glykolyse in allen hier verwendeten Eukaryonten in gleicher Weise gehemmt werden konnte, zeigten sich bei den einzelnen Zelltypen doch deutlich unterschiedliche Konsequenzen für den gesamten Zellstoffwechsel.

So blieb der Einsatz von Pentalenolacton auf Zellen, deren Energieversorgung hauptsächlich durch die mitochondriale Atmungskette gedeckt wird, ohne signifikante Folgen. In primären Hepatocyten-Kulturen war nach Zugabe des Antibioticums weder eine Verschlechterung der Integrität des Zellayers zu beobachten, noch wurde die Fähigkeit der Zellen zur Enzym-

stimulierung (Tryptophan-Pryrrolase) beeinflußt. Gleichzeitig jedoch wurde gemessen, daß die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase vollständig gehemmt war. Und auch in procyclischen Trypanosomen-Kulturen (Vektorform) war -selbst bei Einsatz von hohen Pentalenolacton-Konzentrationen (75 µg/ml)- weder kurz- noch langfristig eine Einbuße der Bewegungsaktivität und somit der Lebensfähigkeit zu beobachten.
Andererseits wurden aber auch Zellen getestet, deren ATP-Versorgung ausschließlich oder doch zumindest überwiegend durch die Glykolyse erfolgt. Hierbei wurden im Einzelnen folgende Ergebnisse erzielt: In Erythrocyten war die Glykolyse in allen verwendeten Systemen (Suspensionen mit verschiedenen Medien, in isoliertem Blut und in situ) innerhalb weniger Minuten vollständig hemmbar. Diesführte unter in situ - Bedingungen zu einer so starken Zellschädigung, daß bei Applikation von 100 µg Pl/Tier stets eine letal verlaufende toxische Hämolyse resultierte. Ehrlich Ascites Tumor Zellen wurden in Suspension, in Kultur und in situ getestet. In der Suspension zeigte sich eine rasch einsetzende Hemmwirkung auf die GAP-DH, was zur Inhibierung der Lactat-Bildung führte. Gleichzeitig sank auch der ATP-Spiegel in den Zellen und es kam zu einem Anstau von Dihydroxyacetonphosphat und Fructose-1,6-Bisphosphat. In Kultur waren die Zellen nach Pl-Behandlung nicht mehr vermehrungsfähig und gingen zugrunde. Zudem waren Ascites-Zellen aus einem Spendertier nach Pentalenolacton - Behandlung nicht mehr infektiös. Aus diesen Ergebnissen kann der Schluß gezogen werden, daß die Glykolyse für Ehrlich Ascites Tumor Zellen essentiell ist, und deren Ausfall nicht, z.B. durch eine gesteigerte Atmungsaktivität, kompensiert werden kann. In situ ließ sich mit Pentalenolacton-Konzentrationen bis zur Letal-Dosis jedoch keine positive Beeinflussung des Tumorwachstums erzielen.
Bereits in früheren Untersuchungen (2) konnte durch Pentalenolacton in Suspensionen von Erythrocyten, die mit Plasmodium vinckei infiziert waren, eine vollständige Hemmung der Glykolyse erzielt werden. D.h., daß in diesem System sowohl eine Inhibierung der Erythrocyten - GAP-DH, als auch der Parasiten - GAP-DH stattfindet. Hier konnte nun gezeigt werden, daß Plasmodium vinckei - infiziertes Blut nach Behandlung mit Pentalenolacton nicht mehr infektiös ist. Darüber hinaus wurden auch Merozoiten, die aus hoch infiziertem Blut isoliert worden waren, durch pentalenolacton innerhalb von 10 min. so stark geschädigt, daß sie eine Infektion

von Labortieren nicht mehr auslösen konnten. Das gleiche Ergebnis ließ sich auch mit Plasmodium falciparum erreichen, die in Zellkulturen untersucht wurden. Auch hier waren Pentalenolacton-behandelte Inokula und Merozoiten, die aus sychronisierten Kulturen isoliert werden konnten, für frische Kulturen nicht mehr infektiös. In Plasmodium vickei - infizierten Mäusen war jedoch ebenfalls mit Pl-Konzentrationen bis zur Letaldosis weder eine Verhinderung noch eine Verlangsamung der Parasitaemie zu erzielen.

Die Blutformen von Trypanosoma brucei brucei wurden anfangs in Suspension und in situ untersucht. Dabei ergab sich eine bemerkenswerte und zunächst unerklärliche Diskrepanz: während Trypanosomen und Erythrocyten in Suspension (auch im selben Testansatz) durch annähernd gleiche Pl-Konzentrationen und in vergleichbaren Zeiträumen gehemmt wurden, waren in situ zwar die Erythrocyten, aber nicht die Trypanosomen zu beeinflussen. Dabei konnte selbst mit der mehrfachen Letaldosis weder eine Inaktivierung der Parasiten, noch eine Verlangsamung der Generationszeit erreicht werden. Das führte zu der Annahme, daß Trypanosomen unter in situ - Bedingungen einen glykolyse-unabhängigen Stoffwechselweg zur Energiegewinnung besitzen könnten. Versuche in Suspensionen mit verschiedenen, komplex zusammengesetzten Medien zeigten jedoch keinerlei Evidenzen für eine solche Möglichkeit. Zudem ließ sich auch in isoliertem Blut mit Pentalenolacton eine Inaktivierung der Trypanosomen erreichen, so daß es nicht mehr infektiös war. Allerdings erfolgte diese Inaktivierung der Parasiten nicht spontan, sondern erst nach etwa 30 min. Darüber hinaus konnte nach einmaliger Pl-Gabe in situ, in den anschliessend isolierten Trypanosomen keine Hemmung der GAP-DH nachgewiesen werden.

Es wurden außerdem in vitro - Kulturen von Trypanosomen (Blutformen) eingerichtet. In diesen Systemen konnte zwar eine vollständige Hemmung der Parasiten erreicht werden, doch verging vom Zeitpunkt der Pentalenolacton-Zugabe bis zum Eintritt der Wirkung etwa 1 h, während mit vergleichbaren Pl-Konzentrationen bei isolierten Trypanosomen in Suspension innerhalb von etwa 15 min. eine deutliche Inaktivierung ermittelt werden konnte. Um Trypanosomen in Kultur zu hemmen, sind also offensichtlich nicht höhere Pl-Konzentrationen nötig als in Suspension, wohl aber gehen die Parasiten in Kultur erst wesentlich später zugrunde. Da nun

andererseits bei der Isolierung von Trypanosomen aus dem Blut stets variable Antigene im Waschpuffer auftraten, existiert eine plausible Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten von Trypanosomen: Bei der Isolierung der Flagellaten wird der Oberflächen-Coat teilweise oder vollständig entfernt, und das Antibioticum kann mehr oder weniger ungehindert in die Trypanosomen eindringen, und führt quasi momentan zur Inaktivierung der GAP-DH. Hingegen existiert in in vitro - Kulturen ein vollständig geschlossener Coat, so daß Pentalenolacton über ein -vermutlich unspezifisches- Transportssystem in die Zellen gelangt. Hier käme in erster Linie wohl die Flagellumtasche in Betracht, da hier regelmäßig Vesikeln abgeschnürt werden und ins Zellinnere wandern.
Es wurde infizierten Mäusen mehrfach in kurzen Zeitabständen Pentalenolacton appliziert, wobei zwar ein signifikanter Rückgang der Trypanosomen-Dichte erzielt werden konnte, eine Klärung der Parasitaemie jedoch nicht möglich war. Immerhin ließ sich so aber auch in situ zeigen, daß Trypanosomen gegenüber Pentalenolacton sensibel sind. Ein alternativer Stoffwechselweg, der den Verlust der Glykolyse kompensieren könnte, besteht für Trypanosomen folglich nicht.
Schließlich wurde auch die Wirkung von Pentalenolacton auf den tierischen Gesamtorganismus untersucht. Dabei zeigte sich sehr rasch die hohe Toxizität der Verbindung; die Letaldosis für Mäuse lag bei ~100 µg/Tier bzw. bei etwa 4 mg/kg Körpergewicht. An deutlichsten trat dabei eine toxisch hämolytische Anämie in Erscheinung, die auch wohl in erster Linie für die letale Wirkung verantwortlich ist. Darüber hinaus traten aber auch an den anderen gut durchbluteten Organen und Geweben mehr oder weniger starke Hemmungen der GAP-DH - Aktivität auf. Durch den Einsatz von radioaktiv markiertem Pentalenolacton konnte gezeigt werden, daß das Antibioticum rasch metabolisch inaktiviert und harnpflichtig ausgeschieden wird. Aus diesem Grunde findet man im Blut auch zu keiner Zeit nach Pl-Applikation einen signifikanten Serumspiegel, so daß mit subletalen Pentalenolacton-Dosen keine Beeinträchtigung des Parasitenwachstums (Plasmodien,Trypanosomen) bzw. der Tumorausbildung (Ehrlich Ascites Zellen) möglich ist.

Wie gezeigt werden konnte, ist Pentalenolacton ein selektiver Inhibitor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die Bedeutung des Antibioticums liegt in der universellen Verwendbarkeit als spezifischer Glyco-

lyse-Inhibitor für Stoffwechsel-Untersuchungen, insbesondere auch in Zellkulturen. Dagegen wird durch die hohe Toxizität und die schnelle metabolische Inaktivierung der Substanz ein sinnvoller Einsatz unter in situ - Bedingungen verhindert. Hier könnten evtl. Pentalenolacton-Modifikationen -entweder Formen, die ebenfalls im Kulturfiltrat der Streptomyceten auftreten, oder chemisch veränderte Derivate- hilfreich sein, sofern sich mit ihnen über längere Zeit ein Serumspiegel erhalten läßt und sie die Zellmembran (vorallem der Erythrocyten) nicht penetrieren können. Unter diesen Bedingungen wäre damit zu rechnen, daß z. B. Trypanosomen das Antibioticum über das unspezifische Transportsystem "Flagellumtasche" aufnehmen würden, so daß eine selektive Bekämpfung möglich wäre.

VI. ANHANG

1. Geräte
2. Verbrauchsmittel
3. Lösungen und Medien
4. Versuchstiere, Zellinien und Stämme der verwendeten Mikroorganismen
5. Allgemeine Methoden

1. Geräte

Einstrahl-Photometer	55 B	Perkin-Elmer; Überlingen, BRD
Zweistrahl-Photometer	UV 210	Shimadzu; Kyoto, Japan
Potentiometer-Schreiber	Servogor S	Goerz; Wien, Österreich
Hochdruck-Flüssigchromatograph (HPLC) mit 2-Kanal-Datensystem	SP 8000	Spectra-Physics; Santa Clara, USA
Szintillationszähler	BF 5003	Berthold; Wildbad, BRD
Luminometer	Biocounter M 2010	Lumac Syst. Inc.; Titusville, USA
Inverses Mikroskop	Diavert	Leitz; Wetzlar, BRD
Durchlicht-Mikroskop	Ortholux II	Leitz; Wetzlar, BRD
Foto-Aufsatz	Leica	Leitz; Wetzlar, BRD
Belichtungsmeßgerät	Mikrosix L	Gossen; Erlangen, BRD
Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)	nach Thoma	Brand; Wertheim, BRD
Zählkammer (Tiefe 0,10 mm)	Neubauer improved	Brand; Wertheim, BRD
Elektronenmikroskop	EM 109	Zeiss; Oberkochem, BRD
Trimmgerät	Pyramitome 11800	LKB; Bromma, Schweden
Mikrotom	Ultrotome 4800	LKB; Stockholm, Schweden
Autoklav	FO / 3-Z1	Fedegari; Padua, Italien
Membran-Filtrierapparatur		Schleicher&Schüll; Dassel, BRD
Sterile Werkbank	Horizontalstrom	Centronik; Berlin, BRD
Sterile Werkbank	Vertikalstrom	CEAG; Bork, BRD
CO_2-Brutschrank		Heraeus; Osterode, BRD
Brutschrank	Lab-Shaker	Braun; Melsungen, BRD
Lyophilisator	L-05	WKF; Darmstadt, BRD
Lagerbehälter für fl. N_2	UB 31 (30 l)	Union Carbide;
Ultraschallgerät	Sonifier B 12	Branson; Danbury, USA
Fermenter (20 l)	Intensor b 20	Giovanola Frères; Monthey, Schweiz
Fraktionssammler	Ultrorac 7000	LKB; Stockholm, Schweden
Gelelektrophorese-Apparatur	Modell 220	Bio-Rad; Richmond, USA
Durchlauf-Milchzentrifuge	KDD 605	Westfalia; Oelde, BRD
Tischzentrifuge	5412	Eppendorf; Hamburg, BRD
Tischzentrifuge	Labofuge II	Heraeus; Osterode, BRD
Tischzentrifuge	Mikrofuge B	Beckmann; Palo Alto, USA
Kühlzentrifuge	G 50 K	WKF; Darmstadt, BRD
Dampfdruck-Osmometer		Knauer; Oberursel, BRD

2. Verbrauchsmittel

Materialien:

Plastik-Petrischalen (4 segmentig)	Falcon; München, BRD
Kultivierungsflaschen (T 75/250 ml)	Nunc; Wiesbaden, BRD
Kultivierungsflaschen (T 25/ 25 ml)	" " "
Kryo-Röhrchen 1,5 ml (steril)	" " "
Tissue Culture Cluster® (24 well)	Costar; Cambridge, USA
Micropipetten 100 µl (Blaubrand®)	Brand; Wertheim, BRD
Monovetten®	Braun; Melsungen, BRD

Chemikalien für die Zellkultur:

Leibovitz-Medium L-15 (ohne Glutamin)	Serva; Heidelberg, BRD
Medium 199 mit Earle´s Salzen (10fach konz., ohne $NaHCO_3$, ohne Glutamin)	" " "
Minimum essential Medium mit Earle´s Salzen (10fach konz., ohne $NaHCO_3$, ohne Glutamin)	Biochrom; Berlin, BRD
Foetales Rinderserum	" " "
Nicht ess. Aminosäuren (100fach konz.)	" " "
Gentamycin-Lösung (10 mg/ml)	" " "
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5/0,2%)	" " "
Dexamethason	Sigma; München, BRD
Insulin	" " "
Collagenase Typ I	" " "
Biotin	" " "
Hämin	" " "
HEPES	" " "
MOPS	" " "
Trypanblau	Flow Lab.; Bonn, BRD
Rinderserumalbumin (reinst)	Behringwerke; Marburg, BRD
Nembutal®	Serva; Heidelberg, BRD
Vetren® (Heparin)	Promonta; Hamburg, BRD
Ficoll-Paque®	Pharmacia; Freiburg, BRD

Enzyme:

Aldolase		(EC 4.1.2.13)
Glycerinkinase	(GK)	(EC 2.7.1.30)
Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	(GDH)	(EC 1.1.1.8)
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	(GAP-DH)	(EC 1.2.1.12)
Glucose-Oxidase	(GOD)	(EC 1.1.3.4)
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	(G-6-P-DH)	(EC 1.1.1.49)
Hexokinase	(HK)	(EC 2.7.1.1)
Lactat-Dehydrogenase	(LDH)	(EC 1.1.1.27)
Luciferin/Luciferase-System		
Peroxidase	(POD)	(EC 1.11.1.7)
Phosphoglycerat-Kinase	(PGK)	(EC 2.7.2.3)
Triosephosphat-Isomerase	(TIM)	(EC 5.3.1.1)

Alle Enzyme wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim bezogen.

Radiochemikalien:

(U-^{14}C)-Glycin	Amersham Buchler; München, BRD
^{3}H-Pentalenolacton	Die Tritium-markierung des Pentalenolactons wurde von der Fa. Amersham Buchler, München durchgeführt.

Alle übrigen verwendeten Substanzen waren analysenreine Produkte folgender Firmen: Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

3. Lösungen und Medien

3.1.0.0. Für Trypanosomen und Microtus montanus - Zellen

3.1.1.0. Für die Isolierung von Trypanosomen aus Blut

3.1.1.1. Sucrose-Citrat - Lösung
(Ansatz 1 l; pH 7.4; Osmol. 338 mOs; bei -20°C mehrere Monate haltbar)

Na_3-Citrat	9,5 g	63 mM
Sucrose	64,2 g	98 mM

Die Lösung wurde in 100 ml Portionen tiefgefroren.

3.1.1.2. Vetren® - Lösung

40 mg Vetren® wurde in 10 ml physiol. NaCl gelöst.

Anwendung: 0,2 ml Vetren® - Lösung / 100 g Körpergewicht (i.v.)

3.1.1.3. Nembutal® - Lösung

30 mg Nembutal® wurde in 1 ml Aqua bidest. gelöst.

Anwendung: 0,2 ml Nembutal® - Lösung / 100 g Körpergewicht (i.p.)

3.1.1.4. Ficoll-Paque® - Lösung
Es wurde eine handelsübliche sterile Lösung verwendet, Dichte 1.077 g/cm³)

Ficoll 400	5,7 g/100 ml
Na-Diatrizoat	9,0 g/100 ml

3.1.2.0. Für Suspensionskulturen von Trypanosomen

3.1.2.1. HEPES - Medium
Lit.: Seglen,P.O.; Exp. Cell Res. 82. 391 (1973)
(Ansatz 1 l; pH 7.4; Osmolarität 310 mOs)

10fach konzentrierte Salzlösung:

NaCl	80,00 g/l
KCl	4,33 "
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2,90 "
KH_2PO_4	0,20 "
$Na_2HPO_4 \times H_2O$	1,40 "

Die Lösung wurde in 100 ml Portionen tiefgefroren.

$CaCl_2$ - Stammlösung:

$CaCl_2 \times H_2O$	14,70 g/100 ml

Herstellung der Gebrauchslösung:

100 ml konzentrierte Salzlösung wurde in 800 ml Auqa bidest. aufgenommen und mit 1 ml $CaCl_2$-Stammlösung, sowie mit 1,8 g Glucose und 2,38 g HEPES versetzt. Nach Einstellen des pH's wurde mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.
Endkonzentrationen:

NaCl	137,00 mM	Na_2HPO_4	0,80 mM
KCl	5,80 mM	$CaCl_2$	1,00 mM
$MgSO_4$	1,20 mM	Glucose	10,00 mM
KH_2PO_4	0,15 mM	HEPES	10,00 mM

3.1.3.0. Für in vitro - Kulturen von Trypanosomen und Microtus montanus Zellen:

3.1.3.1. EARLE's balanced salt solution (EBSS) ohne Ca^{2+} /Mg^{2+}
Verändert nach: Earle,W.R. et al. J. Natl. canc. Inst.4.165(1943)
(Ansatz 1 l; pH 7.4; Osmolarität 313 mOs; ~1 Mon. bei +4°C haltbar)

NaCl	6800 mg/l	116,36 mM
KCl	600 "	8,05 "
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	140 "	1,02 "
Na_2SO_4	200 "	1,41 "
Glucose	1000 "	5,56 "
$NaHCO_3$	2200 "	26,19 "

Zum Ansatz wurde 1 l Aqua bidest. autoklaviert. Anschließend wurden die Salze in 50 - 100 ml des Wassers gelöst und nach Einstellen des pH's unter Sterilfitration zurückgegeben.

3.1.3.2. Trypsin - Lösung

Die handelsübliche Trypsinlösung (10fach konz.) wurde direkt vor dem Trypsinieren mit EBSS ohne Ca/Mg verdünnt.

Trypsin	0,05 %
EDTA	0,02 %

3.1.3.3. Gentamycin - Lösung

Es wurde eine handelsübliche Gentamycin-Lösung verwendet.

Gentamycin	10 mg/ml

3.1.3.4. Kultivierungsmedium
Lit.: Brun,R. et al. J. Protozool. 28. 470 (1981), verändert nach: R. Brun (mündl. Mitteilung)
(Ansatz 1 l; pH 7.4; Osmolarität 358 mOs; ~1 Mon. bei +4°C haltbar)

Zum Ansatz des Mediums wurden 890 ml Aqua bidest. autoklaviert. dann wurden 100 ml MEM-Lösung (10 fach konzentriert) und 10 ml nicht essent. Aminosäuren (100 fach konzentriert) zugesetzt. In 100 ml dieser Lösung wurden 2,2 g $NaHCO_3$, 6,0 g HEPES, 1,0 g Glucose und 296 mg Glutamin gelöst. Nach Einstellen des pH's wurde dieses Konzentrat unter Sterilfiltration zum restlichen Medium zurückgegeben.

Endkonzentrationen:

a) Minimum essential Medium (MEM) ohne Glutamin, ohne $NaHCO_3$
Lit.: Eagle,H. Science 130. 432 (1959)

NaCl	6800 mg/l	L-Methionin	15 mg/l
KCl	400 "	L-Phenylalanin	32 "
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	140 "	L-Threonin	48 "
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200 "	L-Tryptophan	10 "
$CaCl_2$	200 "	L-Tyrosin	36 "
Glucose	1000 "	L-Valin	46 "
Phenolrot	10 "	Folsäure	1 "
		Cholinchlorid	1 "

L-Arginin·HCl	126 mg/l	Nicotinamid	1 mg/l
L-Cystin	24 "	Ca-Pantothenat	1 "
L-Histidin·HClx2H_2O	42 "	Pyridoxal·HCl	1 "
L-Isoleucin	52 "	Thiamin·HCl	1 "
L-Leucin	52 "	Riboflavin	0,1"
L-Lysin·HCl	73 "	I-Inositol	2 "

b) Nicht essentielle Aminosäuren

L-Alanin	8,9 mg/l
L-Asparagin x H_2O	15,0 "
L-Asparaginsäure	13,3 "
L-Glutaminsäure	14,7 "
Glycin	7,5 "
L-Prolin	11,5 "
L-Serin	10,5 "

c) Sonstiges

Glucose	1000 mg/l
HEPES	6000 "
$NaHCO_3$	2200 "
L-Glutamin	296 "

Unmittelbar vor Gebrauch des Kultivierungsmediums wurde Serum (Kaninchen- bzw. foetales Rinderserum) und Antibioticum-Lösung supplementiert.

Mediumzusammensetzung für die Kultivierung von Microtus-Zellen:

Kultivierungsmedium	89 %
foet. Rinderserum	10 %
Gentamycin-Lösung	1 %

Mediumzusammensetzung für die Kultivierung von Trypanosomen der Blutform:

Kultivierungsmedium	84 %
Kaninchenserum	15 %
Gentamycin-Lösung	1 %

3.1.3.5. Kultivierungsmedium für procyclische Trypanosomen-Kulturen
Verändert nach: Brun,R. und Schönenberger,M. Z. Parasitenkd./ Parasit. Res. 66. 17 (1981) und Acta Tropica 36. 289 (1979)
(Ansatz 1 l ; pH 7.3; Osmolarität 330 mOs; ~1 Mon. bei +4°C haltbar)

50 ml MEM mit Earle's Salzen ohne Glutamin und $NaHCO_3$ (10 fach)
50 ml Medium 199 mit Earle's Salzen ohne Glutamin und $NaHCO_3$ (10 fach)
10 ml nicht essentielle Aminosäuren (100 fach)

Zusätzlich wurden eingewogen:

Glucose	1000 mg/l	L-Phenylalanin	80 mg/l
MOPS	5000 "	L-Prolin	600 "
HEPES	8000 "	L-Serin	60 "
$NaHCO_3$	2000 "	L-Taurin	160 "
Na_3-Citrat	880 "	L-Threonin	350 "
		L-Thyrosin	100 "

Na-Pyruvat	100 mg/l	Adenosin	10 mg/l
L-Alanin	200 "	Guanosin	10 "
L-Arginin	100 "	Glucosamin·HCl	50 "
L-Glutamin	300 "	Folsäure	4 "
L-Methionin	70 "	p-Aminobenzoesäure	2 "

Die Lösungen und Substanzen wurden mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt und nach Einstellung des pH's sterilfiltriert. Anschließend wurden 1 ml Biotin-Stammlösung und 3 ml Hämin-Stammlösung steril supplementiert.

Biotin - Stammlösung:

20 mg Biotin / 100 ml Aqua bidest.

Hämin - Stammlösung:

125 mg Hämin / 50 ml 0,05 N NaOH

Unmittelbar vor Gebrauch des Kultivierungsmediums für procyclische Trypanosomen wurden 10 % foetales Rinderserum und 1 % Gentamycin-Lösung supplementiert.

3.1.4.0. Für Dauerkulturen von Trypanosomen und Micotus montanus Zellen

3.1.4.1. Dauerkulturen von Trypanosomen

a) Phosphat-Saline-Glucose-Puffer (PSG-Puffer); 0,06 M; pH 8.0

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,826 g/100 ml
$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	1,369 g/100 ml

Zu 100 ml des obigen Ansatzes PSG-Puffer gibt man:

NaCl	0,26 g	44 mM
Glucose	1,00 g	56 mM

b) Citrat-Lösung

Na_3-Citrat 3,24 g/100 ml 110 mM

Herstellung der Einfrierlösung:

PSG-Puffer und Citrat-Lösung werden im Verhältnis 9:1 gemischt, dann werden 16 % Glycerin zugefügt und die Lösung sterilfiltriert.

3.1.4.2. Dauerkulturen von Microtus montanus Zellen

Zum Einfrieren der fibroblastoiden Zellinie wurde folgendes Medium verwendet:

Kultivierungsmedium	72 %
foetales Rinderserum	20 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	8 %

3.2.0.0. Lösungen und Medien für Primärkulturen von Hepatocyten

3.2.1.0. Für die Isolierung der Hepatocyten

3.2.1.1. Präperfusionsmedium (PPM)
Lit.: Ingebretson,W.R.; Wagle,S.R. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47. 403 (1972)
(Ansatz 1 l; pH 7.4)

NaCl	7,10 g	121,00 mM
KCl	0,40 "	5,36 "
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,19 "	0,77 "
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0,19 "	0,93 "
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	0,06 "	0,34 "
KH_2PO_4	0,06 "	0,44 "
Glucose	1,00 "	5,56 "
EGTA	0,08 "	0,20 "
HEPES	2,38 "	10,00 "

Das Medium wird kurz vor der Verwendung mit O_2 begast.

3.2.1.2. Perfusionsmedium (PM)
(Ansatz 70 ml; pH 7.4)

Zu 70 ml PPM wurden unter sterilen Bedingungen folgende Substanzen zugesetzt:

Glucose	0,20 %
Penicillin/Streptomycin	0,57 %
Rinderserumalbumin	2,29 %

3.2.1.3. Collagenase - Lösung

40 mg Collagenase/10 ml PPM

3.2.1.4. Isolierungsmedium (IM)

Das Medium entspricht dem HEPES-Medium (3.1.2.1.)

3.2.2.1. W/AB 77 - Medium
Lit.: Waymouth,C. J. Natl. Cancer Inst. 22. 1003 (1959);
Verändert nach R. Gebhardt, Doktorarbeit, Tübingen 1980
(Ansatz 1 l; pH 7.4 nach Begasen mit 5 % CO_2)

NaCl	8000 mg/l	δ-Aminolävulinsäure	260 µg/l
KCl	390 "	Ascorbinsäure	11 mg/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	490 "	D-Ca-Panttothenat	1 "
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	760 "	L-Carnitin	198 "
KH_2PO_4	80 "	Cholinchlorid	14 "
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	294 "	Nicotinsäureamid	1 "
$NaHCO_3$	2100 "	Pyridoxal·HCl	1 "
HEPES	2380 "	Riboflavin	1 "
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	1 µg/l	Thiamin·HCl	10 "
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	730 "	D-Biotin	20 µg/l
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	860 "	Folsäure	400 "
Glucose	1000 mg/l	L-Alanin	25 mg/l
L-Lactat	73 "	L-Arginin·HCl	75 "
L-Pyruvat	9 "	L-Asparaginsäure	60 "
Ölsäure	305 "		
L-Cystein·HCl	69 "	L-Methionin	50 "
L-Cystin	15 "	L-Ornithin·HCl	9 "
L-Glutaminsäure	150 "	L-Phenylalanin	50 "
L-Glutamin	292 "	L-Prolin	50 "
Glycin	50 "	L-Serin	25 "
L-Histidin·HCL	164 "	L-Threonin	75 "
L-Isoleucin	25 "	L-Thryptophan	40 "
L-Leucin	50 "	L-Tyrosin	40 "
L-Lysin·HCl	240 "	L-Valin	65 "

Unmittelbar vor Verwendung des Mediums wurden folgende Substanzen unter sterilen Bedingungen zugesetzt:

86 ml W/AB 77 - Medium
10 ml foet. Rinderserum
1 ml Glutamin-Stammlösung
1 ml Gentamycin-Stammlösung
1 ml Insulin-Stammlösung
1 ml Dexamethason-Stammlösung

Glutamin-Stammlösung

1,92 g/100 ml EBSS (Aufbewahrung bei -20°C)

Insulin-Stammlösung

1 mg/10 ml (1 mg Insulin in 60 µl 0,1 N HCl lösen und mit Medium auffüllen. Aufbewahrung bei +4°C)

Dexamethason-Stammlösung

1 mg/25 ml (1 mg Dexamethason in 250 µl Äthanol lösen und mit Medium auffüllen. Aufbewahrung bei +4°C)

3.2.2.2. Leibovitz - Medium (L-15) (ohne Glutamin)
Lit.: Leibovitz,A. Amer. J. Hyg. 78. 173 (1963)

Es wurde das handelsübliche Medium verwendet, das zum Gebrauch folgendermaßen supplementiert wurde:

88 ml L-15
10 ml foet. Rinderserum
1 ml Glutamin-Stammlösung
1 ml Gentamycin-Stammlösung

3.3.0.0. Lösungen und Medien für Ehrlich Ascites Tumor Zellen (EATC)

3.3.1.0. Für Suspensionskulturen von EATC

3.3.1.1. HEPES-Medium

Entspricht 3.1.2.1.

3.3.2.1. Kultivierungsmedium
(Ansatz 1 l; pH 7.4)

NaCl	8000 mg/l	Cholin·HCl	1,5 mg/l
KCl	400 "	I-Inosit	1,5 "
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200 "	Nicotinamid	0,5 "
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	50 "	Ca-Pantothenat	0,5 "
$KH_2PO_4 \times 2\ H_2O$	60 "	Pyridoxal·HCl	0,5 "
Glucose	1000 "	Ribiflavin	0,5 "
$NaHCO_3$	1000 "	Thiamin·HCl	1,0 "
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	184 "	Folsäure	10,0 "
		D-Biotin	10,0 µg/l
L-Carnitin	21 "	L-Phenylalanin	17,0 mg/l
L-Cystin	12 "	L-Threonin	24,0 "
L-Histidin	10 "	L-Tryptophan	4,0 "
L-Isoleucin	26 "	L-Thyrosin	4,0 "
L-Leucin	26 "	L-Valin	24,0 "
L-Methionin	8 "		

Unmittelbar vor Verwendung des Mediums wurden folgende Substanzen unter sterilen Bedingungen zugesetzt:

84 % Kultivierungsmedium
15 % Pferdeserum
1 % Gentamycin-Stammlösung

Herstellung des Pferdeserums:

Das Pferdeserum wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Probst vom physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde frisch vom Schlachthof bezogen, die Herstellung erfolgte dann entsprechend der Angaben für Kaninchenserum.

3.4.0.0. Lösungen für die Anzucht der Streptomyceten

Für die Fermentation der Streptomyceten wurde folgendes definiertes Medium verwendet:

Lit.: Zygmunt,W.A., Appl. Microbiol. 9. 502-507 (1961)
Verändert nach D. Zdunek (74)
Ansatz: 1 l, pH 6.3

D-Mannit	40	g/l
L-Asparagin x H_2O	2,5	g/l
$(NH_4)_2SO_4$	2	g/l
NaCl	1	g/l
K_2HPO_4 x 3 H_2O	3	g/l
$MgSO_4$ x 7 H_2O	1	g/l
$CaCl_2$ x 2 H_2O	4	g/l
$FeSO_4$ x 7 H_2O	20	mg/l
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	10	mg/l

4. Versuchstiere, Zellinien und Stämme der verwendeten Mikroorganismen

4.1.0.0. Versuchstiere

4.1.1.0. Mäuse

Es wurden nur weibliche Reinzuchtmäuse des Stammes NMRI verwendet, die von der Tierzucht-Anstalt in Hannover bezogen wurden. Die Tiere besaßen in der Regel ein Gewicht von etwa 25 g. Im Tierstall herrschte eine Raumtemperatur von 23-25°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 60 %; der Tag/Nacht-Rythmus betrug konstant 12 Stunden. Als Standart-Diät diente Altromin®-Futter und Wasser ad libitum.

4.1.2.0. Ratten

Es wurden stets männliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Gewicht von etwa 300 g verwendet. Die Tiere wurden von der Süddeutschen Tierzuchtfarm KG in Tuttlingen bezogen. Im Tierstall herrschte ca 70 % rel. Luftfeuchtigkeit und eine Raumtemperatur von 20-25°C. Als Standart-Diät diente Alma®-Futter und Wasser ad libitum.

4.2.0.0. Zellinien

4.2.1.0. Fibroblastoide Embryonalzellen aus Microtus montanus (MEF).

Die Zellen wurden dankenswerterweise von Dr. R. Brun und Dr. L. Jenni vom Tropenmedizinischen Institut in Basel zur Verfügung gestellt. Sie wurden von R. Brun aus 14 Tage alten Embryonen der Wühlmaus-Art "Microtus montanus" isoliert und nach einer Passage in flüssigen Stickstoff überführt (153).

4.2.2.0. Ehrlich Ascites Tumor Zellen

Es wurden Stabilate von Dr. A. Jung, Biochem. Inst. in Tübingen erhalten.

4.3.0.0. Stämme der verwendeteten Mikroorganismen

4.3.1.0. Streptomyces arenae TÜ - 469

Der Streptomyceten-Stamm wurde ursprünglich aus einer Bodenprobe aus Obervolta (Afrika) isoliert und ist über das Institut für Mikrobiologie in Tübingen zu uns gelangt. Wir haben lyophilisierte Sporen des Stammes in Wickerham-Medium angezogen und auf "Schrägagarröhrchen" ausgestrichen. Diese Schrägröhrchen-Kulturen wurden bei +4°C gelagert und in regelmäßigen Abständen

subkultiviert. Mittlerweile ist der Stamm unter der Nummer DSM 40 734 von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen in Braunschweig zu beziehen.

4.3.2.0. Plasmodien-Stämme

4.3.2.1. Plasmodium vinckei

Der Stamm wurde von Dr. A. Jung erhalten. Herkunft und Geschichte des Stammes sind nicht mehr zu rekonstruieren.

4.3.2.2. Plasmodium falciparum

Herkunft und Geschichte des verwendeten Stammes sind nicht bekannt.

4.3.3.0. Stämme von Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei, Plimmer & Bradford, 1899

4.3.3.1. Trypanosoma brucei H 81 A (monomorph)

Der Stamm wurde freundlicherweise von Prof. W. Frank vom Tropeninstitut der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt. Herkunft und Geschichte des Stammes sind nicht mehr zu rekonstruieren, er ist aber sicher monomorph.

4.3.3.2. Trypanosoma brucei STIB 427 (monomorph)

Ich danke Herrn Prof. P. Overath vom Max-Planck-Inst. in Tübingen für die Überlassung. Der Stamm wurde 1960 aus einem Schaf in Uganda isoliert. Die wechselhafte Geschichte, die der Stamm in Kultur erfahren hat (155), ist ohne Belang, da die Trypanosomen ohnehin nicht mehr pleomorph sind.

4.3.3.3. Trypanosoma brucei STIB 366 A (pleomorph)

Ursprünglich wurde dieser Stamm 1966 aus einem Warzenschwein in Uganda isoliert und sofort in Dauerkultur genommen. Die Trypanosomen gelangten 1969 zu Dr. Cross und Dr. Manning an das Molteno Institu, Cambridge (1955) und 1974 schließlich zu Dr. Jenni und Dr. Brun nach Basel. Dort wurden nach 4 Rattenpassagen erneut Stabilate angefertigt (156), von denen mir dankenswerterweise einige überlassen wurden. Ich habe nach 2 Mauspassagen ebenfalls Stabilate angelegt, die für die weiteren Versuche verwendet wurden. Dabei wurden maximal bis zu 5 Subpassagen durchgeführt, dann wurden die Trypanosomen erneut aus Stabilaten angezogen.

4.3.3.4. Trypanosoma brucei STIB 247 A (pleomorph)

Der Stamm wurde 1971 im Serengeti Natl. Park (Tansania) aus einer Kuhantilope ("Alcelaphus buselaphus") isoliert und nach einer Rattenpassage in flüssigen Stickstoff überführt. Er wurde zwischenzeitlich cyclisch in Maus → Glossina → Maus - Passage gehalten und dann erneut in Dauerkultur genommen (163). Mir wurden Stabilate dieser Präparation ebenfalls von Dr. Brun und Dr. Jenni zur Verfügung gestellt. Ich habe nach einer Maus-Passage wiederum Stabilate angefertigt, die für weitere Versuche eingesetzt wurden. Um zu vermeiden, daß der Stamm monomorph wird, wurde wie oben beschrieben verfahren.

5. Allgemeine Methoden

5.1.0. Enzymatische Methoden

Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Enzym-Messungen nach den bei Bergmeyer angegebenen Verfahren durchgeführt:

H.U. Bergmeyer (Hrsg.) "Methoden der enzymatischen Analyse"
Bände I und II, 3. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1974

5.1.1. ATP-Bestimmung

Zur ATP-Bestimmung wurden zwei Methoden verwendet, abhängig von der im jeweiligen Ansatz zu erwartenden ATP-Konzentration.

ATP-Bestimmung mit PGK und GAP-DH (Bergmeyer, S. 2128 ff)

Der Bestimmung liegt folgender Mechanismus zugrunde:

$$\text{3-P-Glycerat} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{PGK}} \text{1,3-DPG} + \text{ADP}$$

$$\text{1,3-DPG} + \text{NADH}_2 \xrightleftharpoons{\text{GAP-DH}} \text{GAP} + \text{NAD} + \text{P}_i$$

Zum Zellaufschluß und zur Enteiweißung wurden Aliquods der Zellsuspension entnommen und mit 1/10 des Probenvolumens an Perchlorsäure (70%) behandelt. Nach dem Neutralisieren wurde vom ausgefallenen Perchlorat abzentrifugiert und der klare Überstand in den Test eingesetzt.

ATP-Bestimmung mit Luciferin/Luciferase

Zur Bestimmung der ATP-Konzentration in Trypanosomen wurde stets das Biolumineszenz-Verfahren mit Luciferin/Luciferase verwendet, wobei ein Testsystem der Fa. Boehringer, Mannheim (ATP Biolumineszenz CLS) eingesetzt wurde. Zum Zellaufschluß und zur Enteiweißung wurden 400 µl Probe mit 200 µl HNO_3 (0,6 M) 5 min. bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde neutralisiert, zentrifugiert und der klare Überstand in den Testansatz eingesetzt. Die Messung erfolgte gemäß der Anweisung des Geräteherstellers.

5.1.2. Bestimmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität

Es wurde der Test nach Allison, W.S. und Kaplan, N.O.; J. Biol. Chem. 239.2140 (1964) in der nach Hartmann (17) und Zdunek (44) modifizierten Weise verwendet.

1,63 ml	Pyrophosphatpuffer	(50 mM, pH 8,5)
100 µl	NAD-Lösung	(50 mM)
50 µl	Na-Arsenat-Lösung	(200 mM)
x µl	Rohextrakt*)	

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl GAP (~ 5 mM).

*) Die Menge an Rohextrakt wurde so gewählt, daß gut auswertbare Steigungen erhalten wurden.

Die Reaktion erfolgt nach folgendem Schema:

$$GAP + NAD \xrightleftharpoons{GAP\text{-}DH} 1,3\text{-}DPG + NADH_2$$

5.1.3. Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase - Aktivität

Die Bestimmung der Tryptophan-Pyrrolase erfolgte nach der von H. Metzler entwickelten Methode (89,90), die auf einer Umsetzung des Kynurenins zu einem Azofarbstoff beruht.

5.1.4. Die Bestimmung der Metabolite: Dihydroxyaceton-Phosphat (DAP), Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), Glycerin, Glucose, Lactat und Pyruvat erfolgte nach den bei Bergmeyer angegebenen Methoden.

5.2.0. Sonstige Methoden

5.2.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry (Lowry H.O. et al. J. Biol. Chem. 193.265 (1951)), allerdings in einer leicht modifizierten Form (vergl. 27). Es wurden stets Proteinstandards (Rinderserumalbumin) mitgeführt.

5.2.2. Bestimmung der Pentalenolacton-Konzentration

Es wurde der unter 5.1.2. beschriebene GAP-DH - Test verwendet, der mit käuflicher GAP-DH aus Kaninchenmuskel (GAP-DH Suspension 1 : 400 verdünnt, 20 µl) durchgeführt wurde. Die Pentalenolacton-Stammlösung (in der Regel 5 mg/ml) wurde dazu 1 : 10 000 verdünnt, wobei soviel dieser Pl-Lösung in den Test eingesetzt wurde, daß eine etwa 50 %ige Hemmung der Enzym-Aktivität resultierte. Die aktuelle Pl-Konzentration der Stammlösung wurde dann anhand einer entsprechenden Eichkurve ermittelt (vergl. 44).

5.2.3. Hydrolyse von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Diäthylacetal

Die Hydrolyse erfolgte im wesentlichen nach den Hersteller-Angagen (Boehringer, Mannheim). Dazu wurden 200 mg D,L-GAP-Diäthylacetal (Cyclohexylammoniumsalz) in 36 ml Aqua dest. gelöst und nach Zusatz von 2 ml H_2SO_4 (2M) 7 min. bei 80°C inkubiert. Der Ansatz wurde im Eisbad auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit 2 M Na_2CO_3-Lösung auf pH 4.7 eingestellt und sofort portionsweise eingefroren (-20°C). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls mittels des GAP-DH - Testansatzes mit käuflichem Enzym; üblicherweise lag die GAP-Konzentration bei 5 mM. Tiefgefroren war die Lösung etwa 10 Tage haltbar.

5.2.4. Radioaktivitätsmessungen

Von den wässrigen radioaktiven Proben wurden jeweils Aliquods von 200 µl mit 5 ml Scintillator-Mix (Toluol/Triton-Scintillator) versetzt und im Liquid Scintillation Counter ausgezählt.

Zusammensetzung des Toluol/Triton-Scintillators:

Toluol-Scintillator

2,5 l Toluol p. a.
10 g PPO
0,25 g POPOP

Scintillator-Mix

Mischung von Toluol-Scintillator und Triton-x-100 im Verhältnis 7 : 3.

5.2.5. Bestimmung der Osmolarität

Zur Bestimmung der Osmolarität wurde eine Eichkurve mit definierten NaCl-Konzentrationen aufgenommen. Zur Bestimmung der aktuellen Osmolarität eines Mediums wurde dann stets physiologische Kochsalz-Lösung als Standard verwendet.

5.2.6. Silikonisieren von Glasgeräten

Glasgeräte, die mit Blut bzw. mit Trypanosomen-Suspensionen in Berührung kamen, wurden grundsätzlich silikonisiert. Dazu wurden die Glaswaren in ein Silikon-Ölbad eingetaucht, so daß sie vollständig benetzt waren. Anschließend wurde der Film im Trockenschrank bei 100°C 1 h lang eingebrannt.

5.2.7. Giemsa-Färbung

(Lit.: L. Hallmann: Klin. Chemie und Mikroskopie, Thieme-Verlag Stuttgart 1960)

Blut- bzw. Trypanosomen-Ausstriche wurden an der Luft getrocknet und mit Methanol fixiert. Anschließend wurde mit verdünnter Giemsa-Lösung (250 µl Giemsa-Lösung + 10 ml KPP.(mM, pH 7.2)) 30 min. gefärbt. Die Farblösung wurde mit "scharfem" Wasserstrahl (Spritzflasche) von der Seite her abgespült, 1 min. mit Aqua dest. bedeckt stehen gelassen und schließlich an der Luft getrocknet.

5.2.8. Methode des "dicken Tropfens"

(Lit.: L. Hallmann: Klin. Chemie und Mikroskopie, Thieme-Verlag Stuttgart 1960)

Es wurde ein Bluttropfen auf einen Objektträger aufgebracht und durch Schräghalten des Glases dafür gesorgt, daß ein möglichst gleichmäßiger und dünner Film entstand. Das Blut wurde nicht fixiert, sondern nach dem Trocknen direkt nach Giemsa gefärbt. Die Färbelösung wurde vorsichtig mit Aqua dest. abgespült und der Ausstrich an der Luft getrocknet. Während die Erythrocyten durch diese Prozedur fast vollständig hämolysieren und dadurch im Präparat farblos erscheinen, sind die Parasiten gut angefärbt, und lassen sich auch bei geringer Parasitaemie leicht erkennen.

VII. Literaturverzeichnis

Pentalenolacton

1 Aizawa,S.; Akutzu,H.; Satomi,T.; Kawabata,S.; Sasaki,K.
J. Antibiot. 31. 729-731 (1978)

2 Balla,H. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1979

3 Balla,H.; Duszenko,M.; Mecke,D.
Hoppe Seyler´s Z. Physiol. Chem. 360. 1124 (1979)

4 Cane,D.E.; Rossi,T.
Tetrahedr. Lett. 32. 2973-2974 (1979)

5 Cane,D.E.; Rossi,T.; Pachlatko,J.P.
Tetrahedr. Lett. 38. 3639-3642 (1979)

6 Cane, D.E.; Rossi,T.; Tillman,A.M.; Pachlatko,J.P.
J. Amer. Chem. Soc. 103. 1838-1843 (1981)

7 Cane,D.E.; Tillman,A.M.
J. Amer. Chem. Soc. 105. 122-124 (1983)

8 Cane,D.E. "Biosynthesis of Sesquiterpenes" S. 333-335
In: Porter,J.W.; Spurgeon,S.L. (Ed.)
"Biosynthesis of Isoprenoid Compounds" Vol. 1
John Wiley, New York 1981

9 Danishefski,S.; Hirama,M.; Gombath,K.; Harayama,T.; Berman,E.
J. Amer. Chem. Soc. 100. 6536-6538 (1978)

10 Duszenko,M. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1979

11 Duszenko,M; Balla,H.; Mecke,D.
Biochem. Biophys. Acta 714. 344-350 (1982)

12 English,A.R.; McBride,T.J.; Lynch,J.E.
Antibiot. Annual 1956/1957 S. 676-681

13 Exon,C.; Nobbs,M.; Magnus,P.
Tetrahedron 37. 4515-4519 (1981)

14 Fluharty,A.L.; Ballon,C.E.
J. Biol. Chem. 234. 2517-2522 (1959)

15 Hartmann,S.; Neeff,J.; Mecke,D.
Hoppe Seyler´s Z. Physiol Chem. 359. 273 (1978)

16 Hartmann,S.; Neeff,J.; Heer,U.; Mecke,D.
FEBS-Lett. 93. 339-342 (1978)

17 Hartmann,S. Dissertation, Universität Tübingen 1979

18 Harris,J.J.; Waters,M.
in: P.D. Boyers, Ed.
The Enzymes Vol. 13
Academic Press, New York 1976 S. 1-49

19 Hasenböhler,A. Dissertation, Universität Tübingen 1978

20 Koe,B.K.; Sobin,B.A.; Celmer,W.D.
Antibiot. Annual 1956/1957 S. 672-675

21 Keller-Schierlein,W.; Lemke,J.; Nyfelder,R.; Zähner,H.
Arch. Mikrobiol. 84. 301-316 (1972)

22 Lehmann,J. et al. in Vorbereitung

23 Lehmann,J. "Vergleichstests für Fermentationen" S.11-16
in: "Arbeitsmethoden für die Biotechnologie"
Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für
chem. Apparatewesen e.V. (DECHEMA)
Frankfurt/Main November 1982

24 Lemke,J. Dissertation, Universität Tübingen 1971

25 Mann,K.H.; Mecke,D.
Nature 282. 535-536 (1979)

26 Martin,D.G.; Slomp,G.; Miszak,S.; Duchamp,D.J.; Chidester,C.G.
Tetrahedr. Lett. 56. 4901-4904 (1970)

27 Maurer,K.H. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1981

28 Maurer,K.H.; Pfeiffer,F.; Zehender,H.; Mecke,D.
J. Bacteriol. 153. 930-936 (1983)

29 Parsons,W.H.; Schlessinger,R.H.; Quesada,M.L.
J. Amer. Chem. Soc. 102. 889-890 (1980)

30 Paquette,L.A.; Schostarez,H.; Annis,G.D.
J. Amer. Chem. Soc. 103. 6526-6527 (1981)

31 Paquette,L.A.; Annis,G.D.; Schostarez,H.
J. Amer. Chem. Soc. 104. 6646-6653 (1982)

32 Pfeiffer,F. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1980

33 Pfeiffer,F.; Mecke,D.
Hoppe Seyler´s Z. Physiol. Chem. 361. 314 (1980)

34 Quesada,M.L.; Schlessinger,R.H.; Parsons,W.H.
J. Org. Chem. 43. 3968-3970 (1978)

35 Racker,E.; Klybas,V.; Schramm,M.
J. Biol. Chem. 234. 2510-2516 (1959)

36 Seto,H.; Sasaki,T.; Yonehara,H.; Uzawa,J.
Tetrahedr. Lett. 10. 923-926 (1978)

37 Seto,H.; Sasaki,T.; Uzawa,J.; Takeuchi,S.; Yonehara,H.
Tetrahedr. Lett. 45. 4411-4412 (1978)

38 Seto,H.; Yonehara,H.
J. Antibiot. 33. 92-93 (1980)

39 Takeuchi,S.; Ogawa,Y.; Yoherara,H.
Tetrahedr. Lett. 32. 2737-2740 (1969)

40 Takeuchi,S.; Uzawa,J.; Seto,H.; Yoherara,H.
Trtrahedr. Lett. 34. 2943-2946 (1977)

41 Takahashi,S.; Takeuchi,M.; Arai,M.
J. Antibiot. 36. 226-228 (1983)

42 Tillman,A.M.; Cane,D.E.
J. Antibiot. 36. 170-172 (1983)

43 Webb,J.L.
in: "Enzyme an metabolic inhibitors" Vol. III
Academic Press, New York 1966 S. 1-284

44 Zdunek,D. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1980

45 Zdunek,D.; Maurer,K.H.; Mecke,D.
in Vorbereitung

Ehrlich Ascites Tumor Zellen

46 Aisenberg,A.C.
"The Glycolysis and Respiration of Tumors"
Academ Press, New York 1961

47 Belitzer,W.A.
Biochem. Z. 283. 339 (1936)

48 Belt,J.A.; Thomas,J.A.; Buchsbaum,R.N.; Racher,E.
Biochemistry 18. 3506-3511 (1979)

49 Bossi,D.; Cittadini,A.; Wolf,F.; Milani,A.; Magalini,S.; Terranova,T.
FEBS-Lett. 104. 6-12 (1979)

50 Boxer,G.E.; Devlin,T.M.
Science 134. 1495-1501 (1961)

51 Buffa,P.A.; Peters,R.A.
Nature 163. 914 (1949)

52 Busch,H.; Naiv,P.V.
J. Biol. Chem. 229. 377-387 (1957)

53 Busch,H.
"An Introduction of the Biochemistry of the Cancer Cell"
Academ. Press, New York 1962

54 Cori,C.F.; Cori,G.T.
J. Biol. Chem. 64. 11-22 (1925)

55 Cori,C.F.; Cori,G.T.
J. Biol. Chem. 65. 397-405 (1925)

56 Crabtree,H.G.
Biochem. J. 23. 536-545 (1929)

57 Gosalves,M.; López-Alarcón,L.; Garcia-Suarez,S. Montalvo,A.; Weinhouse,S.
Europ. J. Biochem. 55. 315-321 (1975)

58 Gosalves,M.; Garcia-Suarez,S.; López-Alarcón,L.
Cancer Res. 38. 142-148 (1978)

59 Hinnen,R.; Miyamoto,H.; Racker,E.
J. Membrane Biol. 49. 309-324 (1979)

60 Ibsen,K.H.
Cancer Res. 21. 829-841 (1961)

61 Ibsen,K.H.; Fox,J.P.
Arch. Biochem. Biophys. 112. 580-585 (1965)

62 Johnson,J.H.; Belt,J.A.; Dubinsky,W.P.; Zinniak,A.; Racker,E.
Biochemistry 19. 3836-3840 (1980)

63 Koobs,D.H.; McKee,R.W.
Arch. Biochem. Biophys. 115. 523-535 (1966)

64 Koobs,D.H.
Science 178. 127-133 (1972)

65 Lazo,P.A.
Eur. J. Biochem. 117. 19-25 (1981)

66 Miko,M.; Drobnica,L.; Chance,B.
Cancer Res. 39. 4242-4251 (1979)

67 Papaconstrantinou,J.; Colowick,S.P.
J. Biol. Chem. 236. 278-288 (1961)

68 Potter,V.R.; Busch,H.
Cancer,Res. 10. 353-356 (1950)

69 Piontek,G.E.; Milner,J.A.; Cain,C.A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161. 597-599 (1979)

70 Reitzer,L.J.; Wice,B.M.; Kennell,D.
J. Biol. Chem. 254. 2669-2676 (1979)

71 Sauer,L.A.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 17. 294-300 (1964)

72 Sauer,L.A.
Cancer Res. 30. 1413-1416 (1970)

73 Tsuki,S.; Sukeno,T.; Takena,H.
Arch. Biochem. Biophys. 126. 426-443 (1968)

74 Villalobo,A.; Lehninger,A.M.
J. Biol. Chem. 254. 4352-4358 (1979)

75 Waku,K.; Nakazawa,Y.
Eur. J. Biochem. 100. 317-320 (1979)

76 Warburg,O.
"Über den Stoffwechsel der Tumoren"
Springer Verlag, Berlin 1926

77 Weinhouse,S.
Z. Krebsforsch. und klin. Chem. 87. 115-126 (1976)

Hepatocyten

78 Berry,M.N.; Friend,D.S.
J. Cell Biology 43. 506-520 (1969)

79 Gebhardt,R.; Mecke,D.
Exp. Cell Res. 124. 349-359 (1979)

80 Gebhardt,R.; Mecke,D.
Eur. J. Biochem 97. 29-35 (1979)

81 Gebhardt,R.; Mecke,D.
Eur. J. Biochem. 100. 519-525 (1979)

82 Gebhardt,R. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1976

83 Gebhardt,R. Dissertation, Universität Tübingen 1980

84 Greenhard,O.; Feigdson,P.
J. Biol. Chem. 236. 158-161 (1961)

85 Ingebretson,W.R.; Wagle,S.R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47. 403-410 (1972)

86 Knox,W.E.; Mehler,A.H.
J. Biol. Chem. 187. 419-430 (1950)

87 Knox,W.E.; Mehler,A.H.
Science 113. 237-238 (1951)

88 Knox,W.E.; Auerbach,V.H.
J. Biol. Chem. 214. 307-313 (1965)

89 Metzler,H. Dissertation, Universität Tübingen 1982

90 Metzler,H.; Gebhardt,R.; Oberrauch,W.; Mecke,D.
Anal. Biochem. 121. 10-16 (1982)

91 Nakamara,T.; Shinno,H.; Ichihara,A.
J. Biol. Chem. 255. 7533-7535 (1980)

92 Schimke,R.T.; Sweeny,E.M.; Berlin,C.M.
J. biol. Chem. 240. 322-331 (1965)

93 Schirmer,G. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1978

Plasmodien

94 Gutteridge,W.E.; Dave,D.; Richards,W.H.G.
Biochem. Biophys. Acta 582. 390-401 (1979)

95 Jensen,J.B.; Trager,W.
J. Parasitol. 63. 883-886 (1977)

96 Scheibel,L.W.; Ashton,S.H.; Trager,W.
Exp. Parasitology 47. 410-418 (1979)

97 Sherman,J.W.
Microbiol. Rev. 43. 453-494 (1979)

98 Shermann,J.W.
in: "Malaria and the red cell" S. 206-221
Ciba Foundation Symposium 94
Pitman, London 1983

99 Spira mündl. mitteilung

100 Trager,W.; Jenson,J.B.
Nature 273. 621-622 (1978)

Trypanosomen

101 Ashcroft,M.T.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 54. 44-53 (1960)

102 Baltz,T.; Baltz,D.; Panritzel,R.; Ricket,C.; Lamblin,G,; Degand,P.
FEBS-Lett. 82. 93-96 (1977)

103 Barbet,A.F.; McGuire,T.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75. 1989-1993 (1978)

104 Berards,A.; Michels,P.A.M.; Lincke,C.R.; Borst,P.
Nature 303. 592-597 (1983)

105 Boothroyd,J.C.; Cross,G.A.M.; Hoeijmakers,J.H.J.; Borst,P.
Nature 288. 624-626 (1980)

106 Borst,P.; Cross,G.A.M.
Cell 29. 291-303 (1982)

107 Bowman,J.B.R.; Flynn,J.W. pp
in: Lumsden,W.H.R. and Evans,D.A. (end) 435-476
"Biology of the Kinetoplastida" Vol. 2
Academ Press, New York 1979

108 von Brand,T.
"Biochemistry of Parasites"
Acad. Press, New York 1966

109 Brett,C.T.; Voorheis,H.P.
Eur. J. Biochem. 109. 139-150 (1980)

110 Brohn,F.H.; Clarkson,A.B.
Acta Tropica 35. 23.33 (1978)

111 Brun,R.; Jenni,L.
Acta Tropica 34. 21-33 (1977)

112 Brun,R.; Schönenberger,M.
Acta Tropica 36. 289.292 (1979)

113 Brun,R.; Jenni,L.; Schönenberger,M.; Schell,K.F.
J. Protozool. 28. 470-479 (1981)

114 Brun,R.; Schönenberger,M.
Z. Parasitenkd./Parasitol. Res. 66. 17-24 (1981)

115 Capbern,A.; Giroud,C.; Baltz,T.; Mattern,P.
Exp. Parasitol. 42. 6-13 (1977)

116 Cardoso de Almeida,M.L.; Turner,M.J.
Nature 302. 349-352 (1983)

117 Cross,G.A.M.; Manning,J.C.
Parasitology 67. 315-331 (1973)

118 Cross,G.A.M.
Parasitology 71. 398-417 (1975)

119 Cunningham,J.
Exp. Parasitol. 33. 34-36 (1973)

120 Dixon,H.; Ginger,C.D.; Williamson,J.
Comp. Biochem. Physiol. 39B. 247-266 (1971)

121 Dixon,H.; Ginger,C.D.; Williamson,J.
Comp. Biochem. Physiol. 41B. 1-18 (1972)

122 Duszenko,M.
Biol. in unserer zeit in press

123 Englund,P.T.; Hajduk,S.L.; Marini,J.C.
Ann. Rev. Biochem. 51. 695-726 (1982)

124 Esser,K.M.; Schoenbechler,M.J.; Gingrich,J.B.; Diggs,C.L.
Fed. Proc. 40. 1012-1015 (1981)

125 Evans,D.A.; Brown,R.C.
J. Protozool. 20. 157-160 (1973)

126 Fairlambs,A.
TIBS Juli 1982, 249-253

127 Flynn,J.W.; Bowman,J.B.R.
Comp. Biochem.Physiol. 48B. 261-273 (1974)

128 Flynn,J.W.; Bowman,J.B.R.
Arch. Biochem. Biophys. 200. 401-409 (1980)

129 Fulton,J.D.; Spooner,D.F.
Experiment. Parasit. 8. 137-162 (1959)

130 Gilbert,R.; Klein,R.A.
FEBS-Lett. 141. 271-274 (1982)

131 Grant,P.T.; Fulton,J.D.
Biochem. J. 66. 242-250 (1957)

132 Grant,P.T.; Sargent,J.R.
Biochem. J. 76. 229.237 (1960)

133 Hammond,D.J.; Bowman,J.B.R.
Mol. Biochem. Parasitol. 2. 63-91 (1980)

134 Hill,G.C.
in: H. van den Bosche (ed.) pp. 31-50
"Biochemistry of Parasites and Host Parasite Relationsships."
Elsevier/North Holland, Amsterdam 1976

135 Hill,G.C.; Shimer,S.; Caughey,B.; Sauer,S.
Acta Tropica 35. 201-207 (1978)

136 Hirumi,H.; Doyle,J.J.; Hirumi,K.
Science 196. 992-994 (1977)

137 Hoeijmakers,J.H.J.; Frasch,A.C.C.; Beruards,A.; Borst,P.; Cross,G.A.M.
Nature 284. 78-80 (1980)

138 Hoeijmakers,J.H.J.; Suiders,A.; Jansson,J.W.G.; Borst,P.
Plasmid 5. 329-350 (1981)

139 Hoeijmakers,J.H.J.; Borst,P.; van den Burg,J.; Weissmann,C.; Cross,G.A.M.
Gene 8. 391-417 (1980)

140 Holder,A.A.; Cross,G.A.M.
Mol. Biochem. Parasitol. 2. 135-150 (1981)

141 Ikede,B.O.; Lule,M.; Terry,R.J.
Acta Tropica 34. 53-60 (1977)

142 Jenni,L.; Brun,R.
Transact. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75. 150-151 (1981)

143 Johnson,J.G.; Cross,G.A.M.
J. Protozool. 24. 587-591 (1977)

144 Johnson,J.G.; Cross,G.A.M.
Biochem. J. 178. 689-697 (1979)

145 Jung,W. Diplomarbeit, Universität Tübingen 1980

146 Kilgour,V.
Int. J. Biochem. 12. 325-332 (1980)

147 Klein,R.A.; Angus,J.M.; Waterhouse,A.E.
Molec. and Biochem. Parasitology 6. 93-96 (1982)

148 Langreth,S.G.; Balber,A.E.
J. Protozool. 22. 40-53 (1975)

149 Lanham,S.M.
Nature 218. 1273-1274 (1968)

150 Lanham,S.M. et al.
Exp. Parasitol. 28. 521-526 (1970)

151 Le Page,R.W.F.
Nature 216. 1141-1142 (1967)

152 Le Ray,D.; Barry,J.D.; Vickerman,K.
Nature 273. 300-302 (1978)

153 van Meirvenne,N.; Jansson,P.G.; Magnus,E.
Ann. Soc. Belge Med. Trop. 55. 1-23 (1975)

154 Miller,K.M.; Schoenbechler,M.J.; Gingrich,J.B.; Diggs,C.L.
Fed. Proc. 40. 1011-1012 (1981)

155 Opperdoes,F.R.; Borst,P.; Fonck,K.
FEBS.Lett. 62. 169-172 (1976)

156 Opperdoes,F.R.; Borst,P.; Spits,H.
Eur. J. Biochem. 76. 21-28 (1977)

157 Opperdoes,F.R.; Borst,P.; Balker,S.; Leene,W.
Eur. J. Biochem. 76. 29-39 (1977)

158 Opperdoes,F.R.; Borst,P.
FEBS.Lett. 80. 360-364 (1977)

159 Opperdoes,F.R.
"The Glycosome" S. 543.545
in: Kindl,H.; Lazarow,P.B. (Eds.)
Annals of the New York Acad. of Science Vol. 386 1982

160 Opperdoes,F.R.; Cottem,D.
FEBS-Lett. 143. 60-64 (1982)

161 Parodi,A.J.; Allue,L.A.Q.; Cazzulo,J.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78. 6201-6205 (1981)

162 Pays,E.; van Meirvenne,N.; Le Ray,D.; Steinert,M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 78. 2673-2677 (1981)

163 de Raadt,P.; Seed,J.R.
in: Kreier,J.P. ed. pp. 176-237
"Parasitic Prozozoa" Vol. 1
Academ. Press, New York 1977

164 Rice-Ficht,A.C.; Chen,K.K.; Donelson,J.E.
Nature 294. 53-57 (1981)

165 Rifkin,M.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75. 3450-3454 (1978)

166 Riou,G.F.; Belnat,P.; Benard,J.
J. Biol. Chem. 255. 5141-5144 (1980)

167 Rovis,L.; Barbet,A.F.; Williams,R.O.
Nature 271. 654-656 (1978)

168 Ryley,J.F.
Biochem. J. 62. 215-222 (1956)

169 Steiger,R.F.
"African Trypanosomiases" 155-181
in: Tropical Diseases Research Series, No. 2
Schwabe & Co. AG, Basel 1979

170 Steiger,R.F.; Opperdoes,F.R.; Bontemps,J.
Eur. J. Biochem. 105. 163-175 (1980)

171 Tanner,M. Dissertation, Universität Basel 1980

172 Tobie,E.J.; von Brand,T.; Mehlman,B.
J. Parasitol. 36. 48-54 (1950)

173 Trager,W.
Ann. Trop. Med. Parasit. 53. 473-478 (1959)

174 Turner,M.
Nature 303. 202-203 (1983)

175 Vickerman,K.
Nature 208. 762-766 (1965)

176 Vickerman,K.
J. Cell Science 5. 163-193 (1969)

177 Vickerman,K.
Nature 273. 613-617 (1978)

178 Visser,N.; Opperdoes,F.R.
Eur. J. Biochem. 103. 623-632 (1980)

179 Voorheis,H.P.; Bowles,D.J.; Smith,G.A.
J. Biol. Chem. 257. 2300-2304 (1982)

L E B E N S L A U F

Name	:	Michael Duszenko
Geburtstag	:	15. Januar 1951
Geburtsort	:	Dortmund
Familienstand:		verheiratet seit dem 22. September 1972 mit Sigrid Duszenko, geb. Hoffmann
Kinder	:	Sarah, geboren am 6. Mai 1981

Ausbildung :

1957 - 1965	Volksschule in Dortmund
1965 - 1968	Lehrzeit als Werkzeugmacher
Herbst 1968	Abschluß: Facharbeiterprüfung
1968 - 1969	Berufsfach- und Aufbauschule Dortmund
Sommer 1969	Abschluß: Fachschulreife
1969 - 1971	Westfalenkolleg Dortmund
Herbst 1971	Abschluß: Abitur
1972 - 1977	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
Frühjahr 1978	mündliche Diplomhauptprüfung
Mai 1978 - März 1979	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Wirkung von Pentalenolacton in Eukaryonten-Zellsystemen"
Juli 1979 - April 1983	Promotion bei Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf Eukaryonten-Zellen, insbesondere auf den Energie-Stoffwechsel von Trypanosoma brucei brucei "

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie	:	K. Mörike
Anorganische Chemie	:	W. Rüdorff
Biochemie	:	G. Weitzel, D. Mecke
Botanik	:	F.W. Bentrup
Genetik	:	W. Seyffert
Mathematik	:	E. Pracht
Mikrobiologie	:	V. Braun, H. Zähner
Molekularbiologie	:	P. Hausen, H. Probst
Organische Chemie	:	E. Müller, E. Bayer
Pflanzenphysiologie	:	H. Metzner
Physik	:	H. Krüger
Physikalische Chemie	:	H. Mauser
Physikalische Biochemie	:	K. Wegmann, A. Wendel
Zoologie	:	F.P. Möhres

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353